

Molekularbiologische Techniken

Guido Hermey

- 2.1 DNA – 9
- 2.2 Manipulation von DNA – 10
 - 2.2.1 Restriktion von DNA – 11
 - 2.2.2 Vektoren – 12
 - 2.2.3 DNA-Klonierung – 13
 - 2.2.4 Alternative Klonierungsstrategien – 16
- 2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) – 17
 - 2.3.1 Mutagenese – 19
 - 2.3.2 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) – 21
- 2.4 Woher bekomme ich ein Gen oder eine bestimmte cDNA? – 21
- 2.5 Sequenzierung von DNA – 22
- 2.6 *In silico* – 22
- 2.7 Genomische DNA – 23
- 2.8 RNA – 24
 - 2.8.1 Isolation von RNA – 25
- 2.9 Expressionsanalyse – 25
- 2.10 Microarrays – 27
- 2.11 RNA-Interferenz (RNAi) – 29
- Literatur und World-Wide-Web-Links – 33

Unter Molekularbiologie versteht man im Allgemeinen das Arbeiten mit Nucleinsäuren. Die Techniken werden klassischerweise von der Biochemie, dem Arbeiten mit Proteinen, der Zellbiologie und weiteren Bereichen abgegrenzt. Wir folgen hier dieser Einteilung, allerdings verschwimmt diese nicht nur in unseren Kapiteln, sondern auch im neurowissenschaftlichen Labor, denn hier werden verschiedenste Techniken häufig kombiniert, um die Forschungsziele zu erreichen.

Im Jahre 2003 wurde das Humangenomprojekt beendet und in den folgenden Jahren Genome weiterer Spezies vollständig entschlüsselt. Die Bedeutung und Regulation aller Gene ist bei weitem noch nicht bekannt. Trotzdem bezeichnen inzwischen einige Forscher die Erforschung des Genoms als Forschung des letzten Jahrhunderts und jetzt, in diesem Jahrtausend, würde das alles entscheidende Proteom erforscht. Dies liegt sicherlich nicht nur an dem Geltungsdrang einiger Proteomforscher. Die Identifizierung neuer Gene hat lange Zeit einen ganzen Forschungszweig beschäftigt und genoss sehr viel Aufmerksamkeit. Dieser Forschungszweig wurde schließlich durch viele Großprojekte, die nur dem Aufdecken möglichst vieler Gensequenzen dienten, geradezu industrialisiert. Die Konsequenz ist, dass inzwischen eine neue Gensequenz nur noch ein gelangweiltes Achselzucken hervorrufft.

Für den neurowissenschaftlich arbeitenden Experimentator sind Gene aber immer noch von Bedeutung. Nicht nur weil durch Gene Proteine codiert werden und diese häufig funktionelle Schlüssel-moleküle des Gehirns sind. Die Aufklärung der zeitlichen und räumlichen Expression jedes einzelnen Gens im Nervensystem ist relevant und eine Fortsetzung des Genomprojektes. Weiterhin wird die Regulation der Expression neuronaler Gene erforscht. Letztendlich werden diese beschreibenden Ansätze durch Vergleiche bei unterschiedlichen Entwicklungsstadien, Aktivitätszuständen und Erkrankungen vervollständigt. Viele Versuchsansätze versuchen nicht mehr die Veränderung der Expression einzelner Gene zu beschreiben, sondern zielen auf globalere Aussagen ab. Es wird beispielsweise das Transkriptom, also die Identität aller exprimierten Gene eines bestimmten Gehirnbereichs, beschrieben. Die Folge ist die Erzeugung großer Datenmengen, die nur noch computergestützt ana-

lysiert werden können. Es handelt sich bei solchen Forschungsansätzen in der Regel um explorative, und nicht um Hypothesen-basierte Forschung. Diese explorativen Forschungsansätze dienen nicht nur der Katalogisierung, sondern können darüber hinaus zur Entdeckung neuer Ansatzpunkte, neuer Kandidatengene, führen. Als übergreifendes Ziel verfolgt man dabei, ein bestimmter Genotyp einen bestimmten Phänotyp, bestimmte Eigenschaften, determiniert. Mit anderen Worten, welche Gene beeinflussen eine bestimmte Eigenschaft oder eine Funktion, wie das Auswachsen eines Axons in Richtung eines Zielmoleküls oder ein bestimmtes Verhalten als Antwort auf einen Stimulus.

Die genetische Information wird in Desoxyribonucleinsäure (DNA) gespeichert und mit Hilfe von Ribonucleinsäure (RNA) in biologisch wirksame Proteine übersetzt. Die Methoden zur Erforschung bzw. Manipulation von Genen, DNA und RNA werden nicht nur als molekularbiologische Techniken, sondern auch als Gentechnik bezeichnet. Ein Großteil unseres heutigen neurobiologischen Wissens ist mit Hilfe molekularbiologischer Techniken erforscht worden. Die Erkenntnis, dass die DNA Träger der Erbinformation ist, ist erst etwas mehr als ein halbes Jahrhundert alt. In den 70er Jahren wurde das Klonieren von DNA erfunden und einer wachsenden Gruppe von Forschern zugänglich. Rückblickend haben sich die molekularbiologischen Techniken rasant entwickelt und entwickeln sich immer noch weiter. Aufgrund der breiten Anwendungsmöglichkeiten geht diese Entwicklung auch mit einer zunehmenden Kommerzialisierung einher. Viele grundlegende Techniken werden von verschiedenen Firmen als komplette Baukästen, so genannte *Kits*, mit Puffern und allem Drumherum angeboten. Dies hat das Anwenden von molekularbiologischen Techniken erleichtert. Ein Nachteil ist, dass viele Benutzer dieser Kits gar nicht mehr wissen, was sie bei den einzelnen Reaktionsschritten tun. Ältere Experimentatoren benennen diese nachwachsende Generation von Experimentatoren auch gerne als *Kit Kids*. Das Benutzen von Kits ist aber nicht grundsätzlich anrüchig, es kann sehr sinnvoll und hilfreich sein. Weiterhin eignen sich viele molekularbiologische Techniken zur Automatisierung, was vor allem in der industriellen Forschung und in der Diagnostik ausgenutzt

wird. In diesem Kapitel gehen wir auf die wichtigsten molekularbiologischen Techniken ein.

2.1 DNA

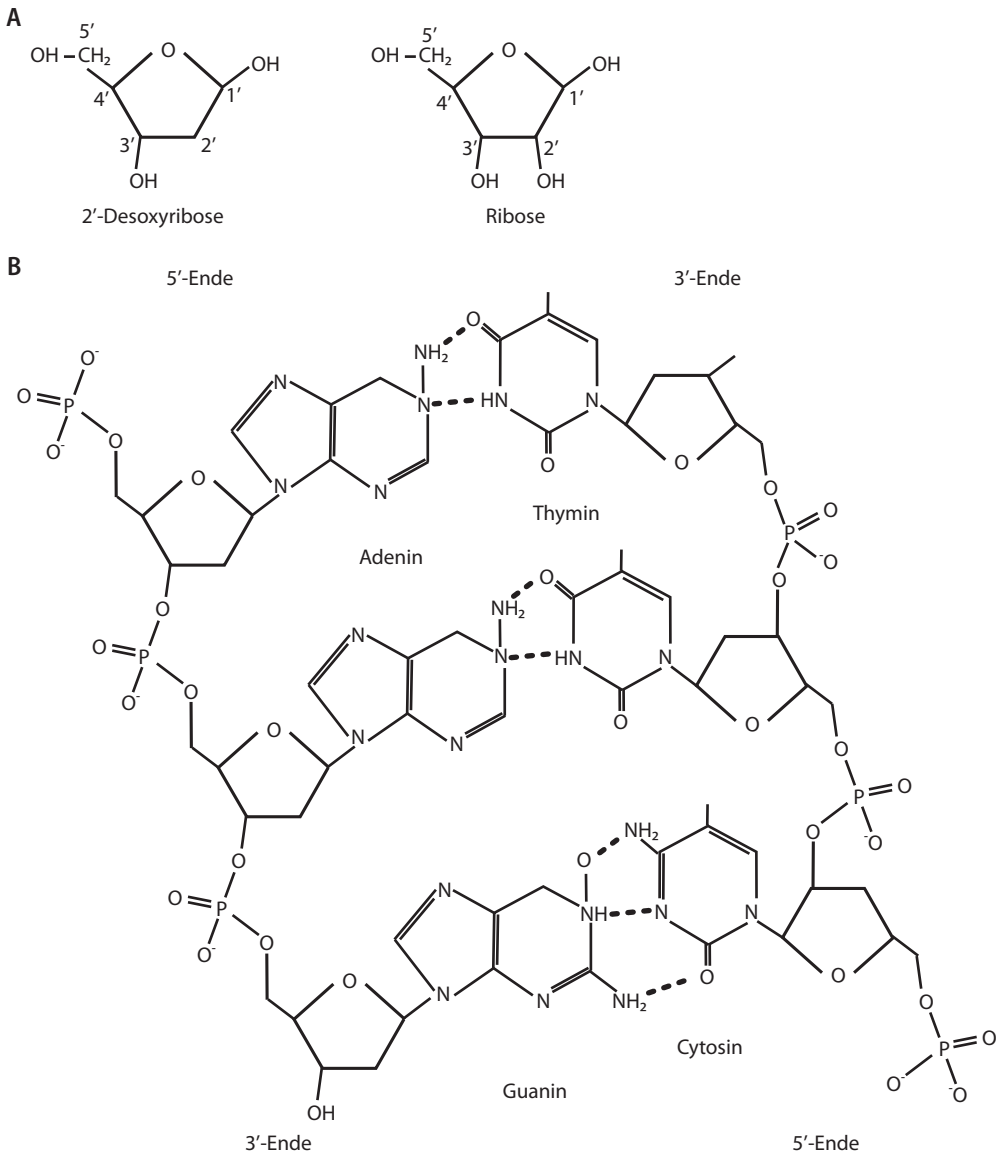
Die ultimative Quelle der genetischen Information ist die Desoxyribonucleinsäure (DNA), ein langes Polymer aus sich wiederholenden Einheiten, den Nucleotiden. Diese bestehen wiederum aus einer Phosphatgruppe, einem Zucker (2-Desoxyribose) und einer Base (Adenin (abgekürzt A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T)). Die Kohlenstoffatome der Desoxyribose sind von 1 bis 5 nummeriert (■ Abb. 2.1). Eine der vier Basen ist jeweils an das 1'-Kohlenstoffatom gebunden, am 5'-Kohlenstoffatom hängt der Phosphatrest. Zwischen der Phosphatgruppe und der OH-Gruppe am 3'-Kohlenstoffatom der Desoxyribose des folgenden Nucleotids wird eine Phosphodiesterbindung geknüpft. So entsteht eine Nucleotidkette mit einem freien Phosphatrest am 5'-Kohlenstoffatom der ersten Desoxyribose und einer freien OH-Gruppe am 3'-Kohlenstoffatom der letzten Desoxyribose. Somit besitzt ein DNA-Strang ein 5'-Ende (»fünf Strich Ende«) und ein 3'-Ende (»drei Strich Ende«) (■ Abb. 2.1). Synthetisiert wird ein DNA-Strang immer von 5' nach 3', denn DNA-Polymerasen können Nucleotide immer nur an die OH-Gruppe am 3'-Ende anfügen, aber nicht ans 5'-Ende. Weiterhin kommt in der Regel DNA nicht als Einzelstrang, sondern als Doppelstrang vor. Dieser ist gewunden, man spricht von der DNA-Doppelhelix. Die beiden Stränge sind komplementär angeordnet, an jedem Ende der Doppelhelix hat einer der beiden Einzelstränge ein 5'-, der andere ein 3'-Ende. Die Basen sind einander zugewandt und bilden Wasserstoffbrücken aus, wobei immer A-T und G-C paart. Zwei Wasserstoffbrücken werden zwischen A und T ausgebildet, drei zwischen G und C (■ Abb. 2.1). Dadurch ist die GC-Paarung fester und es muss mehr Energie aufgewendet werden, um diese zu trennen. Die Abfolge der Basen im Strang codiert die genetische Information. Gibt man eine DNA-Sequenz an, so ist der allgemeine Konsens, die Sequenz von 5' nach 3' zu schreiben. Dies entspricht auch der Richtung, in welcher die genetische Information in eine Aminosäuresequenz übersetzt wird,

das 5'-Ende einer Gensequenz entspricht dem N-Terminus eines Proteins.

Die beiden DNA-Stränge einer DNA-Doppelhelix können problemlos voneinander getrennt werden, entweder durch das Zuführen von Energie oder enzymatisch. Man spricht vom Denaturieren der DNA. Eine kurze Erwärmung auf 95°C reicht dafür aus. Dieser Schritt ist in der Regel reversibel und die entsprechenden Basen können wieder paaren und einen Doppelstrang ausbilden, je nach experimentellem Zusammenhang spricht man vom Hybridisieren oder vom *Annealen* (Aneinanderlagern).

Die genetische Information ist in der DNA-Doppelhelix gespeichert. Gene sind Abschnitte auf der DNA, die für ein Protein codieren, und bestehen aus Exons und Introns. Dieser Bereich wird zunächst in mRNA transkribiert, Introns durch Spleißen entfernt und dann wird die codierende mRNA an den Ribosomen in eine Aminosäuresequenz translatiert. Es wird aber nicht die gesamte mRNA translatiert, es gibt einen Bereich am 5'-Ende, der nicht translatiert wird, die so genannte 5' untranslatierte Region (5'-UTR) und einen Bereich am 3'-Ende, die so genannte 3' untranslatierte Region (3'-UTR). Den Bereich der mRNA, der in Aminosäuresequenz übersetzt wird, bezeichnet man als codierenden Bereich oder *coding sequence* (CDS), im richtigen Leserahmen auch als offenen Leserahmen oder *open reading frame* (ORF).

RNA-Moleküle sind genau wie DNA aufgebaut, allerdings wird statt Thymin Uracil (U) und ein anderer Zucker, Ribose, verwendet. Deshalb die Bezeichnung Ribonucleinsäure (RNA). Weiterhin kommt RNA fast immer als Einzelstrang vor. Basenpaarungen können innerhalb des Einzelstranges stattfinden und bedingen so eine dreidimensionale Struktur. Man kann experimentell mRNA in DNA übersetzen – diese der mRNA komplementären DNA bezeichnet man als cDNA (*complementary DNA*). Manchmal wird auch komplementäre RNA verwendet, diese wird entsprechend als cRNA bezeichnet.

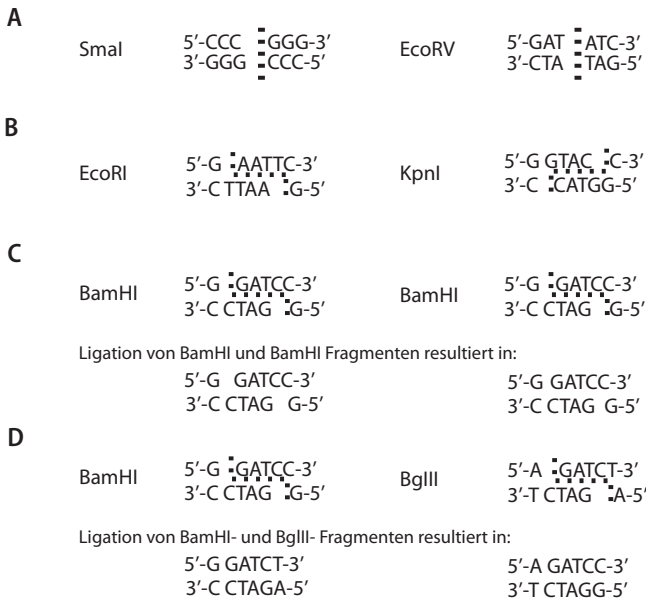


■ **Abb. 2.1** Molekulare Struktur der DNA. (A) Desoxyribose und Ribose, Nummerierung der Kohlenstoffatome ist indiziert. (B) DNA besteht aus einem Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat, das auf der Innenseite Basen trägt. Diese formen Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linien) mit den komplementären Basen und halten die komplementären Stränge zusammen. Die beiden DNA Stränge sind entgegengesetzt angeordnet, ein Strang von 5' nach 3', der andere von 3' nach 5'

2.2 Manipulation von DNA

Das *Molecular Cloning*, die Manipulation von DNA, erlaubt es, spezifische DNA-Fragmente zu schneiden und zusammenzufügen, zu verändern, zu vermehren und zu isolieren. Wir werden zunächst auf

die inzwischen klassische Klonierung eingehen und dann auf neuere technische Möglichkeiten. Für den neurowissenschaftlich arbeitenden Experimentator sind diese Techniken wichtig, denn sie dienen dazu, identifizierte Gene zu manipulieren und z. B. in einen Modellorganismus einzubringen



■ **Abb. 2.2** Restriktionsenzyme. Beispiele für verschiedene Schnittstellen, die von Restriktionsenzymen erkannt werden. Die spezifischen Restriktionsenzyme sind angegeben. Die gestrichelten Linien zeigen an, wie die Trennung verläuft. Es gibt Restriktionsenzyme, die *blunt ends* erzeugen (A), oder *sticky ends* (B), wobei EcoRI einen 5'-Überhang und KpnI einen 3'-Überhang generiert. Gleiche Überhänge, die von einem Restriktionsenzym generiert wurden, paaren und können ligiert und von diesem auch wieder geschnitten werden (C). Gleiche Überhänge, die von verschiedenen Restriktionsenzymen generiert wurden, paaren und können ligiert werden (D), allerdings können diese nicht wieder geschnitten werden, weil die Erkennungssequenz verändert ist

oder ein Protein zu exprimieren. Der Großteil der molekularbiologischen Techniken ist relativ leicht zu erlernen und man braucht keine großen oder außergewöhnlichen Gerätschaften. Was trotzdem nicht heißt, dass diese immer sofort klappen.

2.2.1 Restriktion von DNA

Die Entdeckung von Restriktionsenzymen (oder Restriktionsendonucleasen), die DNA-Sequenzen spezifisch schneiden, hat rekombinante DNA-Techniken erst ermöglicht. Natürlicherweise werden Restriktionsenzyme in Bakterien gebildet. Sie dienen der Abwehr von Bakteriophagen. Die bakterielle DNA ist an den entsprechenden Erkennungssequenzen methyliert und wird nicht geschnitten. Die Bakteriophagen-DNA ist nicht methyliert und wird durch die Restriktionsenzyme fragmentiert.

Verschiedene Firmen stellen Restriktionsenzyme rekombinant her. Der bakterielle Ursprung ist an der Namensgebung noch erkenntlich, so entstammt z. B. das Restriktionsenzym EcoRI aus *Escherichia coli* (= *Eco*). Jedes Restriktionsenzym erkennt eine spezifische Sequenz aus 4–8 Nucleotiden, die normalerweise ein Palindrom ist. Palindrome sind Zeichenketten, die von links nach rechts und von rechts nach links gelesen gleich lauten. Die Wörter »Lagerregal« oder »Radar« und der Satz »O Genie, der Herr ehre Dein Ego!« sind z. B. Palindrome. Da die DNA als komplementärer Doppelstrang vorliegt, besitzen die Erkennungssequenzen eine zweifache Symmetrieachse (■ Abb. 2.2).

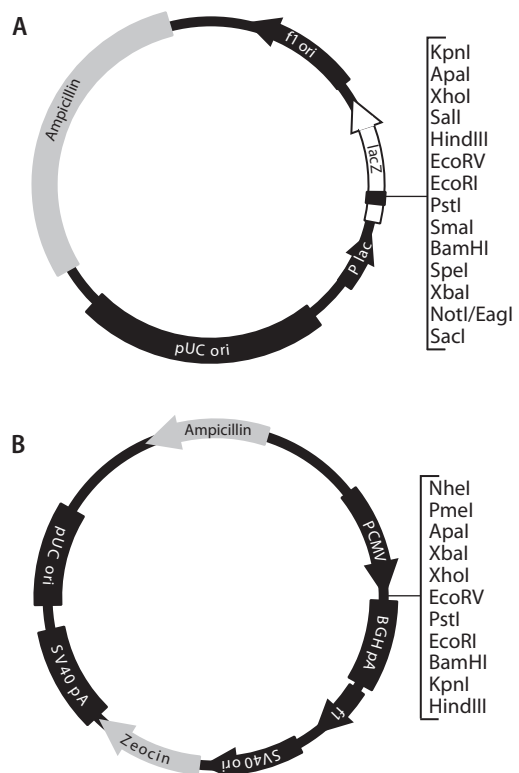
Die Erkennungssequenzen werden von den Enzymen unterschiedlich geschnitten. Entweder werden beide Stränge an der gleichen Stelle geschnitten, so entstehen glatte Enden (*blunt ends*) oder die Stränge werden um einige Basenpaare versetzt

geschnitten, so entstehen Überhänge (*cohesive* oder *sticky ends*). Man unterscheidet 3'- und 5'-Überhänge (■ Abb. 2.2). Die Überhänge von DNA-Fragmenten, die mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten wurden, können wieder miteinander paaren und mit Hilfe eines Enzyms, einer Ligase, zusammengefügt werden. So können auch DNA-Fragmente unterschiedlichen Ursprungs miteinander verbunden werden.

Restriktionsenzyme, die die gleiche Sequenz erkennen und schneiden, bezeichnet man als Isoschizomere. Enzyme, die die gleiche Sequenz erkennen, aber unterschiedlich schneiden, bezeichnet man als Neoschizomere. Es gibt weiterhin Enzyme, die unterschiedliche Sequenzen schneiden, aber den gleichen Überhang erzeugen. Die gleichen Überhänge erlauben ein Zusammenfügen von DNA-Fragmenten, diese können aber in der Regel nicht wieder an der gleichen Stelle geschnitten werden (■ Abb. 2.2). Bei der Verwendung von Restriktionsenzymen ist weiterhin zu beachten, dass viele nicht am äußersten Ende eines DNA-Fragmentes schneiden, sondern zusätzlich zur Erkennungssequenz mehrere flankierende Basen vorhanden sein müssen. Dies ist insbesondere bei einem Doppelverdau und beim Verdau von PCR-Fragmenten von Bedeutung. Sehr nützliche Hinweise zu einzelnen Restriktionsenzymen findet man z. B. auf der Homepage von New England Biolabs (NEB) oder Fermentas oder im Katalog von NEB.

2.2.2 Vektoren

Der neurowissenschaftlich arbeitende Experimentator ist meistens nicht an einem einzigen DNA-Molekül interessiert. Für fast alle Anwendungen soll DNA in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, sie muss vermehrt werden. Das ultimative Werkzeug hierfür sind DNA-Vektoren. Diese replizieren autonom in einem Wirt und können mit DNA-Fragmenten kombiniert werden. Am häufigsten werden Plasmide als Vektoren verwendet. Plasmide sind kleine ringförmige DNA-Moleküle, die in Bakterien vervielfältigt werden, ohne in das bakterielle Genom zu integrieren. In der Regel werden nichtpathogene Stämme des Darmbakteriums *Escherichia Coli* verwendet. Vektoren sind meist



■ **Abb. 2.3** Karten eines typischen Plasmidvektors (A) und eines typischen eukaryotischen Expressionsvektors (B). Ampicillin, Ampicillin Resistenzgen; Ori, Replikationsursprung; lacZ, alpha-Fragment der beta-Galactosidase; p lac, Lac-Promotor; Zeocin, Zeocin Resistenzgen; pCMV, CMV Promotor; BGH pA, Bovine Growth Hormone Polyadenylation Site

nach dem Baukastenprinzip aus verschiedenen funktionellen Modulen aufgebaut. Plasmide sind meist zwischen 3 und 5 kb (kilo Basenpaare) groß und können bis 25 kb Fremd-DNA aufnehmen. Es gibt auch Variationen, artifizelle Chromosomen, die bis zu 1 000 kb Fremd-DNA integrieren.

Zur Vermehrung in Bakterien enthalten Plasmidvektoren entsprechende Module, einen Replikationsstart (*origin of replication*, ori), eine multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, mcs) und einen Selektionsmarker (■ Abb. 2.3). Der Replikationsstart ist eine spezifische Erkennungssequenz, an der die Vermehrung des Vektors initiiert wird. Je nach Anwendung gibt es Unterschiede, üblicherweise verwendet man *high-copy*-Plasmide mit entsprechendem Replikationsstart, der zu hunderten von Plasmiden pro Bakterium und sehr hohen

Ausbeuten bei der Plasmidpräparation führt. Bei *low-copy*-Plasmiden ist die Anzahl an Plasmidkopien wesentlich geringer (10–20), dies ist aber manchmal gewünscht, z. B. wenn besonders problematische große DNA-Fragmente kloniert werden. Natürlich ist dann auch die Ausbeute bei der Plasmidpräparation geringer. Die Multiple-Klonierungsstelle enthält mehrere Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, die den Vektor nur an dieser Stelle schneiden und es ermöglichen, ein DNA-Fragment zu integrieren. Selektioniert werden Bakterien meist mit Antibiotika. Der Selektionsmarker entspricht dann einem Antibiotikaresistenzgen, welches den Bakterien Wachstum in Gegenwart eines Antibiotikums ermöglicht. Vektoren, die diese Elemente enthalten, eignen sich zum Zusammenfügen und zur Vermehrung von DNA-Fragmenten.

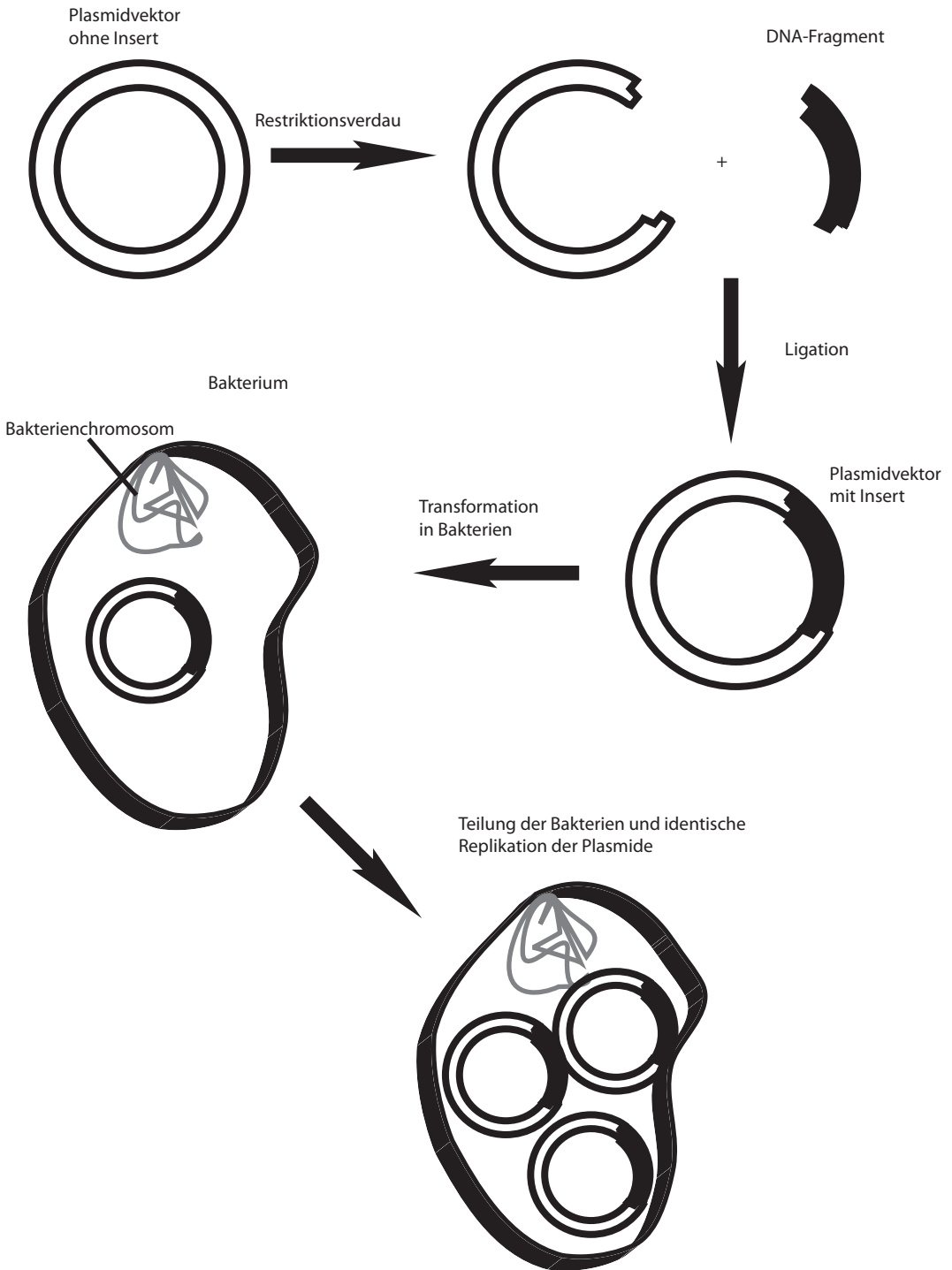
Weitere Elemente können je nach Verwendungszweck in einem DNA-Vektor enthalten sein. Soll die DNA-Sequenz *in vitro* in RNA translatiert werden, so sollte die Multiple-Klonierungsstelle von RNA-Polymerase Promotorsequenzen flankiert sein. Die am häufigsten verwendeten Promotorsequenzen sind SP6, T₃ und T₇. Soll die DNA-Sequenz in Bakterien, Hefen oder Zelllinien exprimiert werden, so sollte ein entsprechender Promotor vorgeschaltet sein. Bei eukaryotischer Expression wird meist eine minimale 3'-UTR inklusive Polyadenylierungsstelle angefügt. Weitere Elemente leiten sich von den verschiedenen Anwendungen ab, so können Abschnitte, die dem Erzeugen von Fusionsproteinen dienen, angehängt sein. Bei der Wahl eines Vektors steht die Anwendung im Vordergrund. Die meisten Vektoren eignen sich sowohl zum Klonieren bzw. Vermehren in Bakterien, als auch für spezielle Anwendungen. Einige Firmen, die unterschiedliche Vektoren anbieten, sind im Anhang dieses Kapitels genannt, zudem einige Nonprofit-orientierte Quellen. Viele Experimentatoren modifizieren Vektoren selbst und stellen diese auf Nachfrage zur Verfügung.

2.2.3 DNA-Klonierung

Auf dem Papier ist es sehr leicht eine Klonierungsstrategie zu erarbeiten. Eine vorhandene DNA wird

mit einem Restriktionsenzym geschnitten, ebenso ein Plasmid mit dem gleichen Restriktionsenzym in der Multiplen-Klonierungsstelle. Beide Fragmente werden ligiert, in Bakterien eingebracht und anschließend kultiviert (transformiert). Das Plasmid wird in den Bakterien repliziert, isoliert, gereinigt und fertig ist der neue Vektor (■ Abb. 2.4). Doch leider funktionieren diese Schritte gerade beim unerfahrenen Experimentator nicht problemlos. Im Folgenden gehen wir kurz auf die einzelnen Schritte ein. Verweisen möchten wir auch auf den *Experimentator Molekularbiologie* und auf »den Maniatis« (Sambrook et al.), in beiden Werken wird weitaus ausführlicher auf viele molekularbiologische Methoden eingegangen. Zu beachten ist auch die Vielfalt an Regeln, für viele in Stein gemeißelte Gesetze, die bei Molekularbiologen insbesondere für das Klonieren gelten. Der eingefleischte Molekularbiologe vertritt diese Dogmen mit großer Vehemenz und wer sich nicht nach diesen richtet, muss sich auch nicht wundern, wenn seine Klonierung nicht klappt. Wechseln Sie das Labor, so begegnen Sie dem nächsten selbsternannten Molekularbiologie-Guru, der auf einmal andere Regeln dogmatisch vertritt. Trotzdem klappt die Kloniererei. Ein Beispiel ist der Hitzeschock für Bakterien nach der Transformation auf Eis. Es gibt Experimentatoren, die vertreten, 3 Minuten bei 37°C sei die einzig wahre Zeitdauer und Temperatur, andere schwören auf 2 Minuten 42°C, wieder andere beharren auf genau 90 Sekunden 42°C oder exakt 60 Sekunden 42°C usw. Sie werden immer jemanden finden, der vollkommen entsetzt ist, dass Sie von einer dieser Vorgaben abweichen könnten. Dementsprechend sollen viele der folgenden Hinweise der Orientierung dienen, den für Sie bestimmten Weg müssen Sie alleine finden.

Restriktionsenzyme benötigen für eine optimale Aktivität unterschiedliche Pufferbedingungen, diese unterscheiden sich im Salzgehalt. Die meisten haben ihr Temperaturoptimum bei 37°C, aber es gibt auch Exoten, die z.B. am besten bei 30°C schneiden. Das Salz- und Temperaturoptimum kann sich auch noch bei den verschiedenen enzymproduzierenden Firmen unterscheiden, was gerade bei einem Herstellerwechsel zur Verwirrung führen kann. Geliefert werden Restriktionsenzyme mit dem entsprechenden Puffer, der nur verdünnt



■ **Abb. 2.4** Prinzip der DNA-Klonierung. Ein relevantes DNA-Fragment wird in einen Plasmidvektor eingebracht. Dieser wird in Bakterien transformiert, wo der Plasmidvektor autonom repliziert. Beachten Sie, dass das Bakterienchromosom an die Zellwand angeheftet ist

werden muss. Zu beachten ist auch, dass Restriktionsenzyme in einer Glycerinlösung geliefert werden. Dies verhindert das Gefrieren der Lösung bei der Lagerung bei -20°C . Wie alle Enzyme sollten auch Restriktionsenzyme nicht nur beim Lagern, sondern auch beim Pipettieren auf Eis oder in einem Kühlblock kalt gehalten werden. Für den Restriktionsverdau sollte man 1–2 μg DNA einsetzen. Mehr schmiert in der Regel zu stark auf dem folgenden Gel. Es gibt Situationen, in denen mehr verdaut werden muss, dann sollten aber auch Volumen und Enzymmenge erhöht werden. Die 1–2 μg DNA können in einem Volumen von 20–50 μl verdaut werden, aber es sollten nicht mehr als 5% (andere meinen 10%) Restriktionsenzym eingesetzt werden, da zu hohe Glycerinkonzentrationen zu unspezifischen Effekten führen können.

Nach dem Restriktionsverdau werden die DNA-Fragmente elektrophoretisch in einem horizontalen Agarosegel getrennt. Die DNA wandert zur Kathode (positiv geladen). Da dieser Pluspol meist rot gekennzeichnet ist, hilft der Merksatz: DNA sieht immer rot. Größere Fragmente wandern langsamer als kleinere, so erfolgt eine Auftrennung nach der Größe. Zur Orientierung lässt man einen Größenstandard mitlaufen. Gerade für den Anfänger lohnt es sich parallel zum Verdauansatz auch eine unverdaute Kontrolle auf dem Gel mitlaufen zu lassen. So wird ersichtlich, ob die DNA vollständig geschnitten wurde. Sichtbar wird die DNA durch Färben des Gels mit Ethidiumbromid. Dies gilt als giftig und mutagen, deshalb werden immer häufiger alternative Farbstoffe, wie z. B. Gel-Red verwendet. Auch wenn diese als weniger giftig gelten, sollte der Experimentator bei allen Arbeiten mit Farbstoffen Handschuhe tragen. Sichtbar werden die Färbungen erst unter UV-Licht. Allerdings sollte hierbei schwaches UV-Licht verwendet werden, da nicht nur die Farbstoffe, sondern auch DNA empfindlich gegenüber UV-Licht ist und fragmentiert werden kann. Natürlich sollte sich auch der Experimentator vor dem UV-Licht schützen, sonst droht ein Sonnenbrand oder eine Schädigung der Augen! Das gewünschte DNA-Fragment wird aus dem Gel ausgeschnitten, unter Erwärmung wieder in Lösung gebracht und entweder durch Bindung an eine Anionenaustauschersäule oder Glasmilch

isoliert. Beide Verfahren sind als Kits von diversen Firmen erhältlich.

Hat man Vektor und DNA (weil das Fragment in den Vektor eingesetzt wird auch als *Insert* bezeichnet) mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten oder mit verschiedenen Restriktionsenzymen, welche den gleichen Überhang erzeugen, oder liegen *blunt ends* vor, so kann die DNA mit speziellen Enzymen, Ligasen, zusammengefügt werden. Hat man ein *blunt* und ein *sticky end*, so kann das *sticky end* durch eine *fill in*-Reaktion zu einem *blunt end* verändert werden. Dafür wird die DNA mit freien Nucleotiden und einer Polymerase gemischt. Es sei aber darauf hingewiesen, dass *blunt ends* häufiger Probleme bereiten als *sticky ends*. Die Ligationseffizienz ist meist geringer, auch gibt es häufiger multiple Insertionen in den Vektor. Verwendet man Überhänge gleicher Sequenz oder nur *blunt ends*, so kann das DNA-Fragment in zwei möglichen Orientierungen in den Vektor ligiert werden. Des Weiteren kann der Vektor ohne Insert ligieren. Dies verhindert man, indem der Vektor dephosphoryliert wird. Nach dem Restriktionsverdau bleiben an den 5'-Enden der DNA-Fragmente Phosphatreste zurück, die für die Ligation benötigt werden. Um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern, entfernt man die Phosphatreste am Vektor mittels einer Phosphatase, z.B. Alkalische Phosphatase (*calf intestine alkaline phosphatase*, CIAP). Das zu klonierende Insert besitzt noch seine Phosphatreste und kann ligiert werden. Verwendet man zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme, die unterschiedliche Überhänge produzieren, so ist eine Dephosphorylierung nicht nötig. Weiterhin bietet dies die Möglichkeit, ein Fragment in der Orientierung gerichtet in den Vektor zu ligieren.

Bringt man DNA in einen Organismus ein, so spricht man bei Bakterien von einer Transformation, bei eukaryotischen Zellen von einer Transfektion. Auf Möglichkeiten der Transfektion wird in ► Kap. 4 (Zelluläre Neurobiologie) eingegangen. Bei der Transformation von Bakterien ist darauf zu achten, dass ein für die Anwendung geeigneter Bakterienstamm verwendet wird. Bakterien müssen zur Transformation vorbereitet werden, kompetent sein. Die Kompetenz der Bakterien ist häufig ein kritischer Schritt bei der Klonierung.

Klassischerweise wird die chemische Kompetenz durch eine Calciumchlorid- oder Rubidiumchlorid-Behandlung erreicht, die kompetenten Bakterien werden anschließend bei -80°C gelagert. Die Transformation findet auf Eis statt und wird durch einen kurzen Hitzeschock beendet. Alternativ können Bakterien durch Elektroporation transformiert werden, man benötigt dafür allerdings ein entsprechendes Gerät. Transformiert man viel, sollten kompetente Bakterien selbst hergestellt werden, die Qualität ist bei einiger Übung ausreichend. Viele Firmen bieten kompetente Bakterien an, unter Umständen können diese eine schwierige Klonierung plötzlich ermöglichen.

Hat man Bakterien transformiert, so werden diese zunächst auf Agarplatten vereinzelt, dann einzelne Bakterienklone in Flüssigmedium vermehrt. Anschließend werden die Bakterien pelletiert und die Plasmide isoliert. Bakterielle genomische DNA ist zirkulär und an der Bakterienzellwand befestigt. An diesem Bakteriengenom ist der neurowissenschaftliche Experimentator nicht interessiert. Bei der Plasmidisolierung sollte eine Verunreinigung mit bakterieller genomischer DNA vermieden werden, da diese bei den meisten nachfolgenden Experimenten stört.

Je nachdem, wie viel Bakterienkultur zur Vermehrung eingesetzt wird, werden unterschiedliche Plasmidmengen isoliert. Man unterscheidet die Minipräparation (1,5–2 ml Bakterienkultur ergibt bei *high-copy*-Plasmiden 2–10 μg Plasmid DNA) und die Maxipräparation (100–200 ml Bakterienkultur ergibt bei *high-copy*-Plasmiden mehr als 500 μg Plasmid DNA). Meist reicht eine Minipräp, vor allem, wenn es sich um einen Zwischenschritt zum endgültigen Konstrukt handelt. In der Regel wird die Plasmid-DNA durch alkalische Lyse isoliert. Die Bakterien werden zunächst pelletiert, resuspendiert und dann durch NaOH-Zugabe lysiert. Je nach Protokoll einige Minuten. Dies führt zu einer partiellen Lyse der Bakterien, die Plasmide werden aus den Bakterien freigesetzt und können von den Bakterienmembranen getrennt werden. Werden die Bakterien zu lange lysiert, führt dies zur Freisetzung der bakteriellen genomischen DNA. Diese wird man bei den folgenden Reinigungsschritten nicht mehr los, weshalb nicht zu lange lysiert werden sollte. Anschließend folgt

ein Neutralisierungsschritt und die lysierten Bakterien werden entweder durch Zentrifugation oder bei Maxipräparationen durch eine Filtration abgetrennt. Dann wird die DNA entweder gefällt oder bei der Verwendung eines kommerziellen Kits an eine positiv geladene Matrix einer Säule gebunden und von dieser eluiert.

DNA kann in Gegenwart eines Salzes gefällt werden. Hierfür wird entweder Ethanol oder Isopropanol verwendet, als Salz wird bei der Ethanolfällung meist Natriumacetat (3 M, pH 5) alternativ auch Lithiumchlorid verwendet. Die ausgefallene DNA wird pelletiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und so von Salzen befreit. Gelöst wird die DNA in Wasser, die Zugabe von etwas Salz erhöht die Löslichkeit (z. B. 1/10 TE), viel Salz verbessert nicht nur Löslichkeit, sondern schützt die DNA vor DNasen (Tris-EDTA-Puffer, TE). Überlegen Sie sich, wofür Sie die gelöste DNA verwenden wollen – zu viel Salz ist häufig nicht erwünscht.

2.2.4 Alternative Klonierungsstrategien

Bei vielen Fragestellungen muss ein und dasselbe Gen oder DNA-Fragment für verschiedene Experimente in unterschiedliche Vektoren kloniert werden. Viele Experimentatoren sind deshalb dazu übergegangen durch die Verwendung der gleichen Restriktionsschnittstellen ein Fragment in unterschiedliche Vektoren zu klonieren. Dieses Verfahren ist natürlich einerseits durch die unterschiedlichen Multiplen-Klonierungsstellen der Vektoren begrenzt, andererseits durch das natürliche Vorkommen spezifischer Restriktionsschnittstellen in der relevanten DNA oder dem Gen. Man kann natürlich versuchen, sehr selten schneidende Restriktionsschnittstellen zu verwenden und diese in die Multiplen-Klonierungsstellen der relevanten Vektoren einzubringen. Dieses Prinzip wendet z.B. die Firma Origene an. Alle Gene, die die Firma anbietet, sind durch Schneiden mit den Restriktionsenzymen SgfI und MluI in die von Origene vertriebenen Shuttle-Vektoren in der Orientierung gerichtet zu klonieren. Dadurch kann relativ einfach und schnell zwischen den verschiedenen Vektoren gewechselt werden.

Während dieses System immer noch auf den klassischen Klonierungsstrategien, der Verwendung von Restriktionsenzymen, beruht, wurden inzwischen weitere Klonierungsmethoden etabliert. Diese beruhen auf der Verwendung von Bakteriophagen-Rekombinasen aus den Bakteriophagen Lambda oder P1. Grundsätzlich wird das relevante DNA-Fragment bei diesen Systemen von Rekombinase-Erkennungssequenzen flankiert und in definierter Orientierung rekombiniert. Es gibt unterschiedliche kommerzielle Systeme, etwa CreatorTM von Clontech oder GatewayTM von Invitrogen. Diese unterscheiden sich in der verwendeten Rekombinase. Grundsätzlich wird mit einem Donorvektor gearbeitet, der bereits die relevante DNA enthält, und mit einem Akzeptorvektor entweder verschmilzt oder mit einem Teil des Akzeptorvektors ausgetauscht wird. Der Vorteil ist die leichte und schnelle Übertragung von einem Insert in viele verschiedene Vektoren.

2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

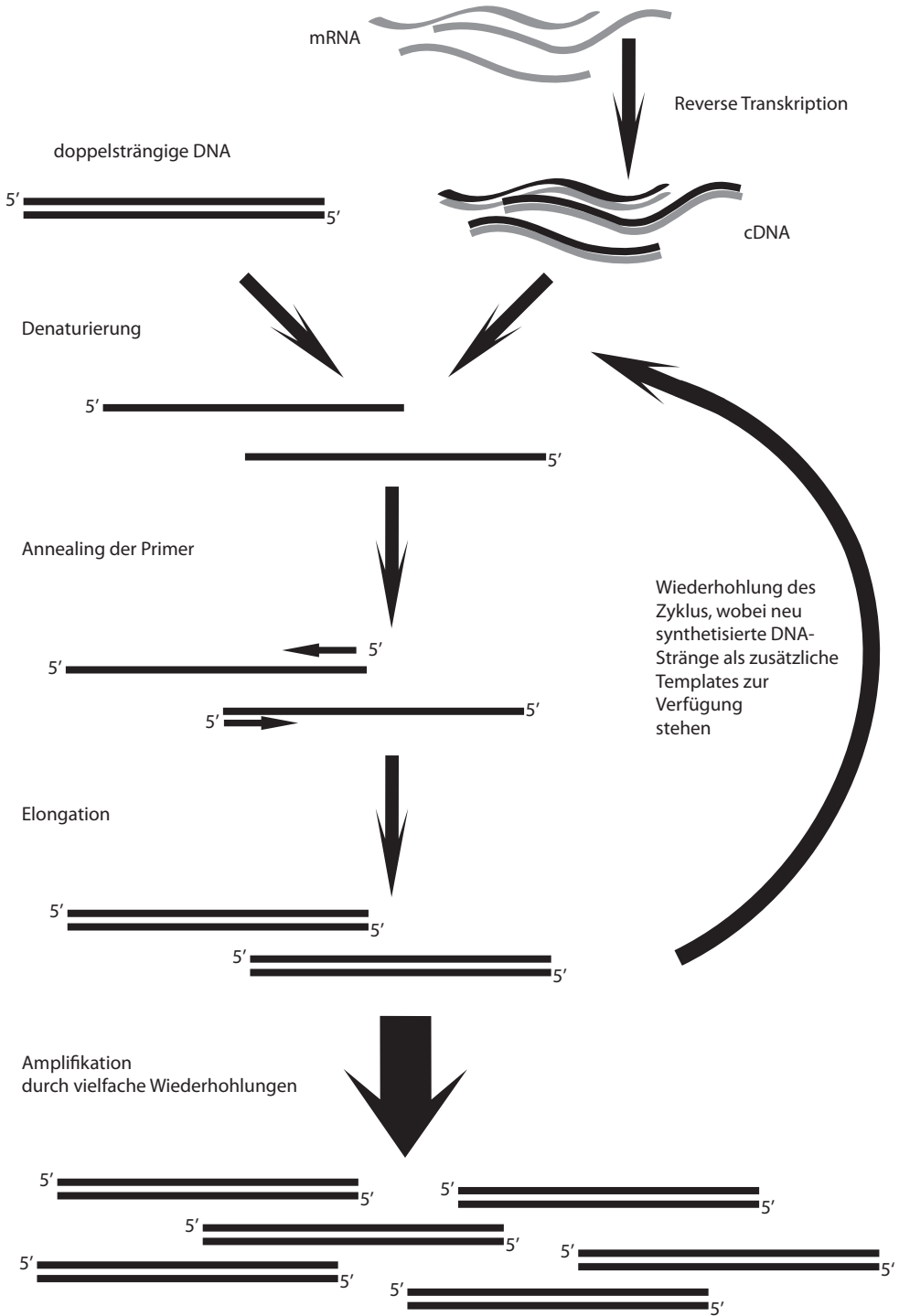
Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist DIE Methode zur Manipulation von DNA und auch sie hat die Molekularbiologie revolutioniert. Sie basiert auf der Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase, die einzelsträngige kurze Oligonucleotide an geringen Mengen einer Ausgangs-DNA (*Template DNA*) verlängert und so das DNA-Template vermehrt. Die Reaktion findet unter kontrolliertem und sich wiederholendem Erhitzen und Abkühlen statt. Die PCR eignet sich sowohl zum Aufspüren und Nachweisen von DNA, und dies sowohl qualitativ als auch quantitativ, aber auch zum gezielten Verändern bzw. Mutieren von DNA-Sequenzen und zum Umschreiben von RNA in cDNA. Auch bei den PCR-basierten Methoden gilt: Es gibt viele »Gesetze«, je nach Experimentator – finden Sie ihren eigenen Weg.

Das Prinzip der PCR ist in der Theorie sehr einfach (■ Abb. 2.5). Zur Vervielfältigung eines definierten Bereiches einer doppelsträngigen DNA benötigt man zwei Oligonucleotide, die komplementär zu den Enden des zu amplifizierenden Bereiches sind. Das Verfahren besteht aus drei Schritten, die

zyklisch wiederholt werden. Bei dem Denaturierungsschritt wird der Reaktionsmix auf 94°C erhitzt, dadurch wird der Doppelstrang des DNA-Templates getrennt. Beim zweiten Schritt, dem Annealing, wird die Temperatur wieder gesenkt, so dass die Primer (Oligonucleotide) an die DNA-Einzelstränge hybridisieren können. Im dritten Schritt, der *Elongation*, wird die Temperatur wieder erhöht, und zwar auf das Temperaturoptimum der thermostabilen DNA-Polymerase (72°C). Diese verlängert die Oligonucleotide und synthetisiert so einen dem jeweiligen Template komplementären DNA-Strang. Solch ein Zyklus wird mehrfach, in der Regel ca. 30 Mal, wiederholt. Dadurch wird die Template-DNA vervielfacht. Die Reaktionen finden in einem *Thermocycler* statt, ein programmierbarer Heizblock mit beheiztem Deckel, der für schnelle Temperaturänderungen optimiert ist.

Der initiale Schritt beinhaltet eine verlängerte (2–5 Minuten) Denaturierungszeit. Dies soll gewährleisten, dass das Template vollständig denaturiert wird. Zwar wird eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet, aber auch diese büßt bei sehr langer Erhitzung ihre Aktivität ein, deshalb sollte die Denaturierungsdauer möglichst gering gehalten werden. Die Polymerase verlängert die Oligonucleotide, indem sie am 3'-Ende Desoxyribonucleotidtriphosphate (dNTPs) anhängt. Diese müssen natürlich der Reaktion zugegeben werden. An den oben beschriebenen Zyklus schließt sich eine finale Elongation (ca. 10 Minuten bei 72°C) an, durch die sichergestellt werden soll, dass alle DNA-Produkte vollständig verlängert wurden.

Bei den Primern handelt es sich um synthetisch hergestellte Oligonucleotide, die in der Regel gekauft werden. Diese haben meist eine Länge von 20–30bp. Bei dem Design der Primer folgen unterschiedliche Experimentatoren verschiedenen Regeln. Eigentlich muss jeweils empirisch ermittelt werden, ob ein Primer funktioniert. Ein paar Aspekte sollten aber beachtet werden, um dies wahrscheinlicher zu machen. Die Primer sollten eine ähnliche Schmelztemperatur haben. Diese liegt meist zwischen 50 und 72°C und wird vom GC-Gehalt und der Länge bestimmt. Es gibt verschiedene Methoden zur Berechnung der Schmelztemperatur, alles sind theoretische Annäherungen. Viele Firmen berechnen auf ihren Homepages die



Schmelztemperatur, wenn man Primer bestellt. Es gibt aber auch verschiedene Internetressourcen (siehe Kapitelende). Die Schmelztemperatur kann auch als Hinweis für die Annealingtemperatur genutzt werden. Die Primer sollten außerdem keine Dimere oder Haarnadelschleifen bilden, dies kann man auch mit verschiedener Freeware analysieren.

Bei der Auswahl der DNA-Polymerase ist zu beachten, dass es unterschiedliche Produkte gibt. Generell kann zwischen der »normalen« Taq (Taq-DNA-Polymerase isoliert aus *Thermus aquaticus*), die keine 3'-5'-Exonucleaseaktivität und deshalb keine fehlerkorrigierende Eigenschaften (*proofreading activity*) besitzt, und anderen Polymerasen, wie Pfu oder Pwo, die solch eine *proofreading activity* besitzen, unterschieden werden. Die Fehler rate liegt bei der Taq-Polymerase bei ca. 10^{-5} , bei den *proofreading*-Polymerasen bei ca. 10^{-6} , diese machen also weniger Fehler. Die Fehlerrate ist aber grundsätzlich auch von den Reaktionsbedingungen abhängig. Neben der Fehlerkorrektur gibt es einen weiteren Unterschied. Die *proofreading*-Polymerasen erzeugen glatte Enden an den DNA-Doppelsträngen, während die Taq-Polymerase ein zusätzliches Adenosin an das 3'-Ende anhängt. Dies ermöglicht die so genannte TA-Klonierung von PCR Fragmenten, die mit der Taq-Polymerase erzeugt wurden. Hierbei verwendet man linearisierte Plasmide, die ihrerseits einen Thymidin-Überhang am 3'-Ende tragen. Die eine Base langen Überhänge führen meistens zu einer verbesserten Ligations-effizienz.

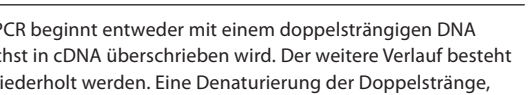
Trotz des einfachen Prinzips funktionieren PCR Reaktionen häufig nicht auf Anhieb. Meist hilft es schon, die Annealing Temperatur zu verändern, wer Zeit sparen will, probiert im Gradienten-Cycler mehrere Temperaturen parallel aus. Mg^{2+} beeinflusst als Co-Faktor die Funktion der Polymerase. Gerne wird die Mg^{2+} Konzentration variiert und ist nicht in jedem mit der Polymerase gelieferten Puffer enthalten. Die einzelnen Komponenten des Reaktionsmixes haben einen Einfluss aufeinander.

So binden z. B. freie Nucleotide freies Mg^{2+} , welches dann nicht mehr der Polymerase zur Verfügung steht. Beliebt sind auch weitere Zusätze wie Dimethylsulfoxid (DMSO). Gerade bei GC-reichen Sequenzen hilft bis zu 5% DMSO, das gewünschte Produkt zu erhalten.

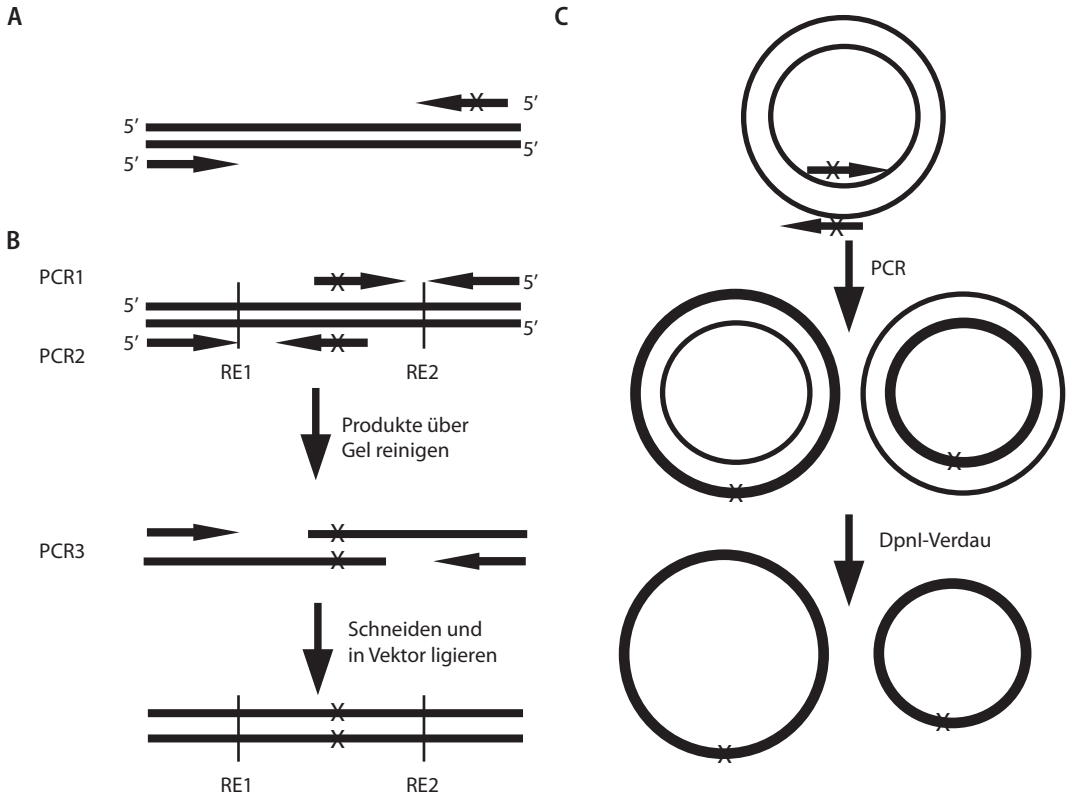
Es gibt übrigens PCR-Anwendungen, bei denen nicht nur zwei, sondern mehrere Primer eingesetzt werden. Dies bezeichnet man als Multiplex-PCR und kann z. B. bei der Genotypisierung von transgenen Tieren sinnvoll sein, bei der sowohl das Wildtyp-Allel als auch das veränderte Allel nachgewiesen werden soll.

2.3.1 Mutagenese

Häufig sollen DNA-Sequenzen spezifisch verändert, d. h. mutiert werden. Dabei kann es sich um Punktmutationen handeln, so dass in einem Expressionsvektor der genetische Code für eine bestimmte Aminosäure verändert ist. Es kann sich aber auch um eine Deletion handeln, um das Einführen von Restriktionsschnittstellen oder anderer Sequenzen.

Die einfachste Variante ist, dass die Veränderung nahe dem 3'- oder 5'-Ende eingeführt werden soll. Dann trägt ein Primer eine Veränderung in der DNA-Sequenz. Die Modifikation sollte im 5'-Bereich des Primers liegen, denn so ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass die Polymerase die Modifikation nicht toleriert. Soll innerhalb einer DNA-Sequenz eine Modifikation eingefügt werden, so müssen drei PCR-Reaktionen durchgeführt werden. Wie in  Abb. 2.6 gezeigt, sollten zwei äußere Primer außerhalb von zwei Restriktionsschnittstellen liegen, die für die Klonierung des veränderten Fragmentes in die Ursprungs-DNA verwendet werden können. Zwei innen liegende Primer tragen die Modifikation. Die ersten beiden Reaktionen werden in getrennten Reaktionsansätzen mit jeweils einem äußeren und einem inneren Primer durch-

■ **Abb. 2.5** Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR beginnt entweder mit einem doppelsträngigen DNA Template oder mit mRNA, die durch einen RT-PCR Schritt zunächst in cDNA übersrieben wird. Der weitere Verlauf besteht nach der initialen Denaturierung aus 3 Schritten, die zyklisch wiederholt werden. Eine Denaturierung der Doppelstränge, Annealen der Primer und die Elongation der Primer am 3'-Ende



■ **Abb. 2.6** DNA-Mutagenese mit modifizierten Primern. (A) Eine Mutation wird mit einem Primer eingeführt. (B) Mutation durch mehrere PCR Schritte. (C) Amplifikation eines vollständigen Vektors mit modifizierten Primern

geführt. Die zwei resultierenden DNA-Fragmente werden dann mit Hilfe der äußeren Primer in einer dritten PCR vervollständigt.

Will man ein DNA-Fragment austauschen, besteht eine weitere Alternative darin, ein DNA-Fragment, welches die gewünschte Mutation trägt, synthetisieren zu lassen und über einen Restriktionsverdau in das relevante Plasmid einzufügen. Man spart sich dabei die PCR. Es lohnt sich inzwischen durchaus ein Preisvergleich. Die Synthese kurzer DNA-Fragmente kann eine kostengünstige Alternative sein.

Eine weitere Methode nutzt zwei modifizierte Primer zur Amplifikation beider Stränge eines gesamten Plasmids (■ Abb. 2.6). Anschließend wird der Reaktionsansatz mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. DpnI schneidet spezifisch methylierte DNA. Das Template Plasmid entstammt Bakterien und ist methyliert, wird also verdaut. Das in der PCR amplifizierte und die Modifikation

tragende Plasmid ist nicht methyliert, wird somit nicht verdaut und kann zur Vermehrung wiederum transformiert werden. Das Verfahren ist vielen als Quick Change Mutagenese bekannt, benannt nach dem gleichnamigen Kit der Firma Stratagene. Diese Strategie, Mutationen einzuführen, kann weiter modifiziert werden. So stellen z. B. Chiu et al. ein Verfahren vor, bei dem 4 Primer verwendet werden, um ein Plasmid zu amplifizieren. Dadurch wird nicht nur eine Modifikation erreicht, sondern auch Deletionen und Insertionen. Grundsätzlich sollte bei der Amplifikation eines ganzen Plasmids darauf geachtet werden, nur wenige Zyklen zu fahren und somit die Wahrscheinlichkeit zu minimieren, ungewollte Mutationen zu generieren. Natürlich sollte in dem Fall unbedingt eine *proofreading*-Polymerase verwendet werden. Eine Sequenzierung des gesamten Plasmids ist je nach Anwendung in Erwägung zu ziehen.

2.3.2 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Als Template dient bei der RT-PCR mRNA, die amplifizierte DNA ist komplementär zur mRNA und wird als cDNA bezeichnet. Die Reverse Transkriptase synthetisiert zunächst an der mRNA einen komplementären cDNA-Strang. An diesem wird dann durch eine Polymerase ein Doppelstrang synthetisiert, dieser kann dann als Template für herkömmliche PCR Reaktionen dienen. So kann entweder eine bestimmte mRNA nachgewiesen oder aber eine cDNA zur weiteren Klonierung hergestellt werden.

2.4 Woher bekomme ich ein Gen oder eine bestimmte cDNA?

Die Zeiten, in denen cDNA-Banken nach neuen Genen gescreent wurden, sind langsam aber sicher vorbei. Neue Gene werden meist nur noch für exotische Organismen identifiziert und dies in der Regel durch groß angelegte Sequenzierungsprojekte. Das bedeutet aber nicht, dass der neuwissenschaftlich forschende Experimentator keine cDNAs mehr benötigt. Nahezu alle Gene des Menschen oder der Maus sind bekannt, allerdings ist die Funktion sehr vieler Gene überhaupt nicht beschrieben. Identifizieren Sie z. B. einen neuen Interaktionspartner oder ein Gen, welches unter bestimmten Bedingungen im Nervensystem exprimiert wird, und wollen Sie mit diesem Kandidatengen weiter arbeiten, so benötigen Sie eine cDNA, welche die gesamte codierende Sequenz repräsentiert.

Die klassische Herangehensweise ist, diese selbst zu klonieren. Entweder screenen Sie eine entsprechende cDNA-Bank oder Sie reinigen mRNA aus Gewebe oder Zellen, welche ihr Gen stark exprimieren, designen spezifische Primer korrespondierend zum 5'-Ende und 3'-Ende und führen eine RT-PCR gefolgt von einer PCR durch.

Natürlich können Sie auch andere Experimentatoren fragen, ob diese Ihnen eine bestimmte cDNA zur Verfügung stellen. Die meisten Wissenschaftler tun dies gerne. Es gibt aber auch Wissenschaftler, die auf eine entsprechende E-Mail gar

nicht reagieren. Eine wirklich schnelle und kostengünstige Alternative ist der Kauf von cDNA. Es gibt verschiedene Firmen und Nonprofit-orientierte Organisationen, die cDNAs anbieten. Zu nennen sind da einerseits alle Institutionen, die an Genomprojekten beteiligt sind bzw. waren. Aus diesen sind Firmen hervorgegangen, die sich um die kostengünstige Verteilung von cDNAs, aber auch von genomischen DNAs, kümmern. In Deutschland verkauft ImaGenes günstig cDNA-Banken und Klone. Eine weitere Quelle ist die Nonprofit-Organisation Addgene – eine Plattform zur Verteilung von Plasmiden, die publiziert wurden. Firmen wie Invitrogen oder Origene bieten ebenfalls viele cDNAs an (siehe Anhang).

Eine weitere Möglichkeit, die eigene Herstellung einer spezifischen DNA zu umgehen, ist die DNA synthetisieren zu lassen. Eine Vielzahl von Firmen haben die DNA-Synthese in ihrem Programm. Ein Vorteil ist, dass gewünschte Modifikationen direkt vorgenommen werden können und man somit Zeit und Kosten für weitere Klonierungsschritte spart. Zurzeit ist die DNA-Synthese noch relativ teuer, doch ist zu erwarten, dass die Preise sinken werden. Berechnet wird nach Basenpaaren, somit steigt der Preis mit der Länge. Für kurze DNA-Fragmente ist die Synthese bereits heute eine nicht allzu kostenintensive Alternative. Und es deutet sich die Entwicklung an, dass gerade Labore, in denen nicht sehr viel kloniert wird, in Zukunft auf synthetisch hergestellte DNA zurückgreifen werden.

Sucht man einen cDNA-Klon und ist die codierende Sequenz nicht sehr lang, so stehen meistens kostengünstige Klone aus cDNA-Banken zur Verfügung, aber auch die cDNA-Synthese wäre aufgrund der Länge nicht zu teuer. Problematisch wird es erst, wenn sehr lange cDNAs benötigt werden, die codierende Sequenzen von mehr als 3 000 Basenpaaren besitzen. Sehr lange cDNAs sind in den meisten cDNA-Banken unterrepräsentiert und deshalb selten. Häufig findet man nur partielle Klone, die angeboten werden, wenn man Glück hat kann man aus den Fragmenten die vollständige Sequenz zusammenfügen. Zieht man eine Synthese sehr langer DNA-Stränge in Erwägung stellt man fest, dass das Budget, welches einem Experimentator zur Verfügung steht, dafür selten reicht.

2.5 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA, sei es von PCR-Produkten oder Plasmiden, wird in der Regel nicht mehr vom Experimentator selbst durchgeführt. An vielen Forschungsinstituten gibt es Sequenzierungsservices oder eine Firma wird mit der Sequenzierung beauftragt. Die Konkurrenz ist groß, die Preise inzwischen gering. Meist wird mit der Didesoxy-Methode nach Sanger sequenziert. Bei der Methode werden komplementäre DNA-Stränge wie bei einer PCR *in vitro* synthetisiert. Zusätzlich zu den Desoxyribonucleotidtriphosphaten enthält das Inkubationsgemisch noch ein 2', 3'-Didesoxyanalog eines Nucleotidtriphosphates. Der Einbau dieses Analogons blockiert die weitere Verlängerung des DNA-Stranges, weil ihm ein 3'-Hydroxylende fehlt, um die nächste Phosphodiesterbindung zu knüpfen. So entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge mit einem Didesoxyanalogon am 3'-Ende. Früher nutzte man radioaktiv markierte Didesoxyanaloge, heute werden in der Regel fluoreszierende Markierungen benutzt. Entweder wird der Primer markiert oder die Didesoxynucleotide werden mit vier unterschiedlichen Farbstoffen versehen, was inzwischen häufiger angewendet wird. Dann werden die unterschiedlich langen Produkte im Gel oder in linear polymerisierten Gelen in Glaskapillaren aufgetrennt. Verschiedene Firmen bieten eine voll automatisierte Sequenzierung an. Der Experimentator erhält dann seine DNA-Sequenz als so genannten *Trace-File*, in dem die Basenreihenfolge durch farbige Kurven dargestellt ist und mit Computerprogrammen mit bereits existierenden Sequenzen verglichen werden kann. Je nach Gerät und Qualität der DNA können Leseweiten von 500–1 000 bp erreicht werden.

Neben dieser inzwischen als klassisch zu betrachtenden Sequenzierungstechnik hat sich das so genannte *next-generation sequencing* oder *second-generation sequencing* etabliert. Bei diesen Verfahren müssen die zu sequenzierenden Proben zunächst fragmentiert werden. Im Vergleich zur klassischen Sanger-Sequenzierung entfällt eine Klonierung in einen Vektor. Stattdessen werden Adaptoren an die Fragmente ligiert. Es werden dann je nach Methode und Gerät 30–400 bp lange

Sequenzen detektiert. Bei diesen Hochdurchsatzmethoden werden sehr schnell mehrere Reaktionen parallel analysiert. So liefert z. B. der Genome Analyzer II von Solexa/Illumina bis zu 270 Millionen kurze Sequenzen pro Lauf, bei einer Leselänge von 100 Basen. Es gibt weitere Gerätehersteller wie Roche oder Applied Biosystems, die alle eigene leistungsstarke Sequenzierungsstrategien entwickelt haben. Gemeinsam ist allen, dass Sequenzrohdaten im Gigabasenbereich in wenigen Tagen generiert werden, allerdings stellt die sich daran anschließende bioinformatische Auswertung eine große Herausforderung dar.

Zur Anwendung kommen die neuen Technologien einerseits bei großen Sequenzierungsprojekten wie dem 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org>), das als Ziel die Erforschung der individuellen Variabilität des humanen Genoms hat. Hierfür wird das Genom von mindestens 1000 Personen unterschiedlicher Ethnien analysiert. Da die Sequenzierung nicht nur schneller, sondern auch kostengünstiger wird, könnte am Ende die standardmäßige Sequenzierung ganzer Patientengenome stehen. Aber die Entwicklung ist nicht nur für Genomanalyse und Diagnostik relevant. Die schnelle *de novo*-Sequenzierung ermöglicht auch die Transkriptom-Analyse, und es lassen sich nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Aussagen treffen. Somit stehen die neuen Sequenzierungstechniken in direkter Konkurrenz zur Microarray-Analyse.

2.6 *In silico*

Der enorme Umfang der zur Verfügung stehenden genetischen Information ist zum Teil nur mit computergestützten Analysen zu bearbeiten. Einerseits gibt es Computerprogramme, die das Planen und Analysieren von Klonierungsschritten ganz stark vereinfachen, so z. B. Lasergene von DNA-Star oder Vector NTI (war bis 2009 Freeware für den akademischen Bereich). Dem Experimentator, der viel klonieren muss, ist das Benutzen solcher Software zu empfehlen.

Häufig müssen DNA-Sequenzen identifiziert, zugeordnet oder verglichen werden. Das National Center for Biotechnology Information (NCBI)

stellt eine Reihe von freien Softwarewerkzeugen zur Verfügung. Unter anderem auch das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), das Programm vergleicht Nucleotid oder Proteinsequenzen. So können Sie eine unbekannte DNA-Sequenz mit diesem Programm zuordnen, die genomische Sequenz zu einer cDNA finden, aber auch eine Sequenz auf ihre Richtigkeit prüfen.

Ein weiteres Hilfsmittel bietet das Ensembl-Projekt. Der Ensembl-Browser ähnelt den BLAST-Funktionen, es liegt aber ein großer Schwerpunkt auf genomischen Sequenzen. Die Genome etlicher Spezies sind hier annotiert. Neben genomischen Informationen finden sich auch Darstellungen und Verweise zu transkribierten Sequenzen, Splice-Varianten, und man kann sogar die Probesets der Microarrays von Affymetrix einzelnen Genen graphisch zuordnen. Es gibt die Möglichkeit, die präsentierten Elemente selbst zu wählen. Der Ensembl-Browser ist ein gutes Beispiel für die vernetzte Darstellung des gegenwärtigen Wissensstands im Internet und der technischen Ressourcen, die zur Verfügung stehen und derer man erst durch die vernetzte Darstellung gewahr wird.

2.7 Genomische DNA

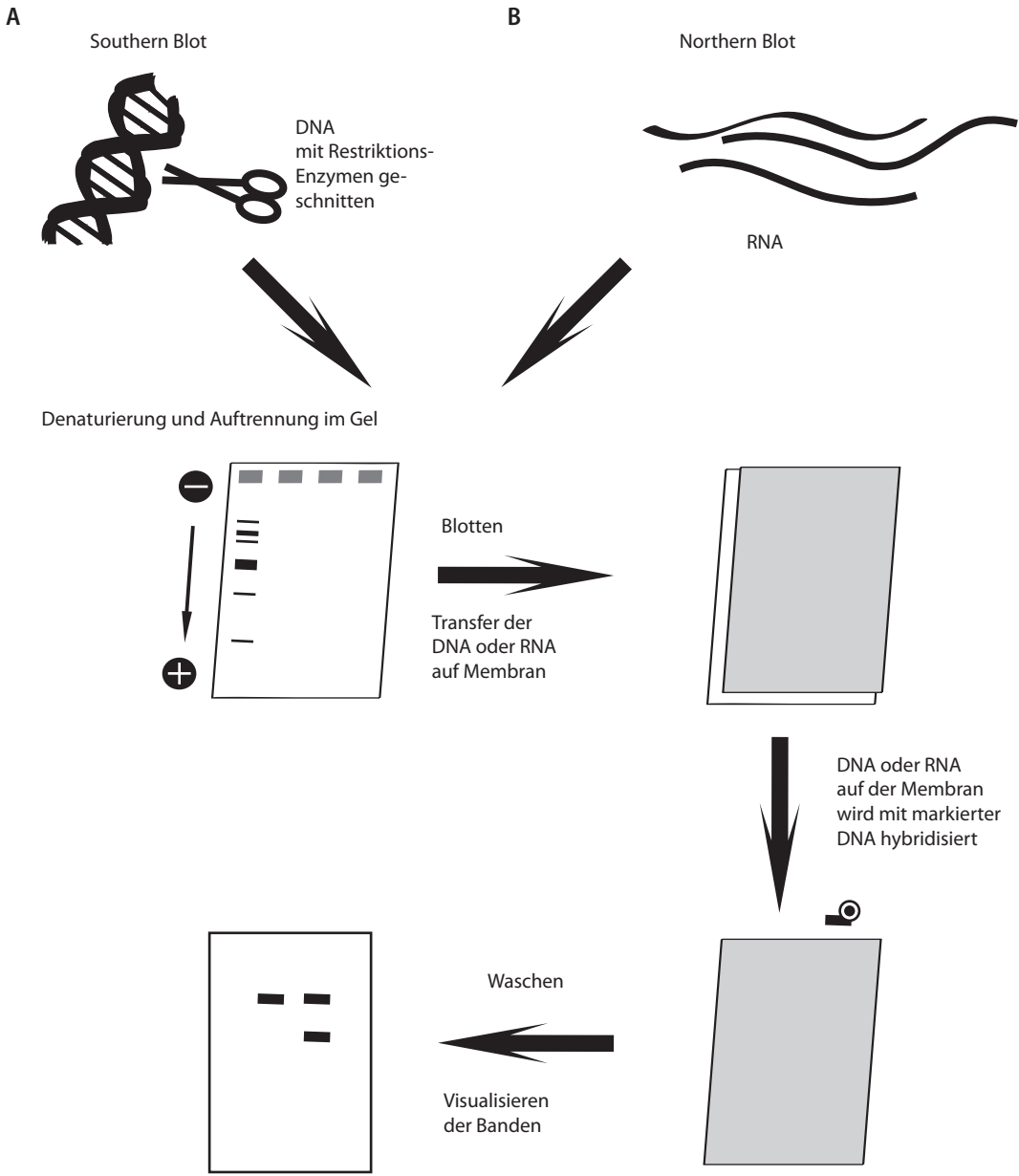
Genomische DNA zeichnet sich durch ihre extreme Länge aus. Dem neurowissenschaftlichen Experimentator begegnet sie in der Regel als störender Schleim beim Lysieren von Gewebe oder Zellen, und meist ist er nicht an ihr interessiert. Arbeiten Sie allerdings an neurogenetischen Fragestellungen oder mit gentechnisch veränderten Mäusen und manipulieren Sie so das Genom, dann brauchen Sie genomische DNA als Ausgangsmaterial, z.B. um einen *Targeting*-Vektor zu konstruieren, oder Sie müssen genomische DNA isolieren, um den Genotyp zu bestimmen.

Präpariert wird genomische DNA zur Bestimmung des Genotyps aus einer Schwanz- oder Ohrbiopsie. Diese können bis zur Aufarbeitung eingefroren werden. Das Gewebe wird in einem Proteinase K-Puffer (100 mM Tris pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 200 mM NaCl, 0,1 mg/ml Proteinase K) 4 Stunden bei 50°C oder über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Dadurch wird das Gewebe

aufgelöst, die DNA bleibt intakt. Anschließend wird die Lösung 10 Minuten auf 95°C erhitzt, nach dem Abkühlen wird zur Beseitigung der RNA eine RNase-A-Lösung hinzugegeben. Nun folgt entweder eine Genotypisierung durch PCR-Reaktionen oder eine Phenol/Chloroform-Reinigung, gefolgt von einer DNA-Fällung. Dann eignet sich die genomische DNA auch für andere Analysen, wie z. B. einen Southern Blot. Phenol/Chloroform gilt als sehr giftig und ist unbedingt nur unter einem Abzug zu verwenden. Verschiedene Firmen bieten inzwischen ungiftige bzw. weniger giftige Alternativenstoffe an.

Der so genannte Southern Blot wurde von Edwin Southern entwickelt, daher der Name. Andere Blotmethoden wurden in Anlehnung an den Southern Blot als Northern- und Western Blot bezeichnet. Allgemein wird bei einem Southern Blot DNA durch Restriktionsenzyme in Fragmente geschnitten, diese werden elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und diese mit einem markierten relevanten DNA-Fragment hybridisiert (■ Abb. 2.7). So kann die Anwesenheit des relevanten DNA-Abschnittes in einem DNA Gemisch nachgewiesen werden. Meist wird genomische DNA, die mit Restriktionsenzymen geschnitten wurde, auf diese Weise analysiert. Grundsätzlich kann aber auch jede andere DNA verwendet werden. Nach der Auftrennung im Gel wird dieses zunächst in HCl gebadet, dies verbessert die Übertragung großer Fragmente auf die Membran. Wichtig ist, dass die DNA im Gel als Einzelstrang vorliegt. Deshalb denaturiert man sie im Gel mit einer NaOH-Lösung.

Übertragen (geblottet) wird die DNA durch die Ausnutzung von Kapillarkräften auf eine Nylonmembran. Dann wird die DNA auf der Membran durch Erhitzen (2 Std. 80°C) oder durch UV-Licht-Bestrahlung fixiert. Die UV-Licht-Bestrahlung wird auch als *Cross-Linken* bezeichnet. Die auf die Membran fixierte DNA wird anschließend mit einem relevanten DNA-Fragment hybridisiert. Dieses kann radioaktiv mit P^{32} oder nicht radioaktiv z. B. mit Digoxigenin markiert sein. Abhängig von der Markierung erfolgt dann eine Detektion mittels Autoradiogramm oder Antikörper und Farbreaktion.



■ **Abb. 2.7** Southern und Northern Blot. (A) Beim Southern Blot wird DNA zunächst mit Restriktionsenzymen verdaut. (B) Beim Northern Blot wird RNA direkt verwendet. Bei beiden Verfahren wird die Nucleinsäure denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Vom Gel auf eine Membran übertragen und diese mit einer markierten DNA Sonde hybridisiert sowie spezifische Banden nachgewiesen

2.8 RNA

RNA unterscheidet sich von der Molekülstruktur eigentlich nicht sonderlich von DNA. Beim experi-

mentellen Arbeiten gibt es aber einen sehr großen Unterschied. Dieser liegt in den Enzymen, welche die Nucleinsäuren abbauen. RNasen sind stabiler, weiter verbreitet als DNasen und brauchen kei-

ne Co-Faktoren. Ursprung der Enzyme sind zum Teil wir selbst und die uns bewohnenden Bakterien. Deshalb besteht bei Arbeiten mit RNA immer die Möglichkeit, dass das Molekül, mit dem man arbeitet, währenddessen abgebaut wird. Schützen kann man sich davor durch sauberes Arbeiten, Handschuhe tragen, Lösungen und Gefäße nur für Arbeiten mit RNA reservieren. Häufig wird Wasser mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt, um es RNase-frei zu bekommen. Das DEPC wird im Wasser gelöst und unter Rühren über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zu beachten ist, dass DEPC beim Autoklavieren in CO₂ und Ethanol zerfällt. Weiterhin bindet DEPC an primäre und sekundäre Amine und ist deshalb nicht für alle Puffer geeignet (z.B. Tris-Puffer). Glas und Geräte kann man Hitzesterilisieren (Backen bei 180°) oder auch mit Wasserstoffperoxid behandeln.

2.8.1 Isolation von RNA

Gesamt-RNA kann sehr effektiv mit einer Guanidinisothiocyanat-Phenol-Extraktion isoliert werden. Zellen oder Gewebe werden mit der Reagenz inkubiert, dies denaturiert Proteine und inaktiviert somit auch RNasen. Die Methode wurde von Chomczynski und Sacchi beschrieben, sie benannten Guanidinisothiocyanat-Phenol als TRI-Reagenz, kommerziell wird es z. B. als TRIzol (Invitrogen) oder TRIzol (Appllichem) vertrieben. Bei vielen Anwendungen ist eine Isolation der mRNA notwendig, hierfür empfiehlt es sich, einen der vielen kommerziell erhältlichen Kits zu nutzen. Die Elemente werden RNase-frei geliefert, gereinigt wird über Säulen.

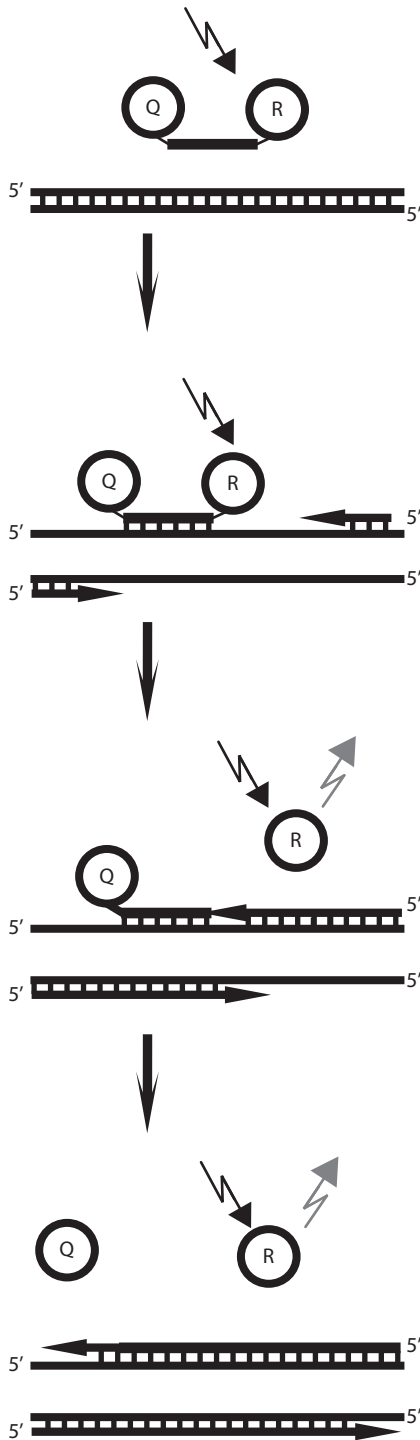
2.9 Expressionsanalyse

Je nach apparativer Ausstattung und Fragestellung hat der Experimentator unterschiedliche Möglichkeiten, die Expression eines oder mehrerer Gene nachzuweisen. Möchten Sie einfach nur wissen, wann und wo ein Gen exprimiert wird, so lohnt sich zunächst eine Datenbankanalyse. Hilfreich ist z. B. die Homepage von Mouse Genome Informatics, MGI. Dort kann man nach der Expression von

Genen suchen. Verwiesen wird nicht nur auf relevante Literatur, sondern auch auf den Allen Brain Atlas, auf Gene Expression Omnibus, Geo und auf ArrayExpress Gene Expression Atlas.

Häufig soll aber experimentell gezeigt werden, dass ein Gen exprimiert wird. Die klassische Methode ist der Northern Blot (■ Abb. 2.7), der immer noch angewendet wird. Ähnlich wie beim Southern Blot, wird mRNA im Gel aufgetrennt. Da meist Gelkammern auch für andere Anwendungen verwendet werden empfiehlt es sich, diese gründlich zu reinigen, um RNasen zu eliminieren, z. B. mit Wasserstoffperoxid. Elektrophoretisch aufgetrennt wird RNA in der Gegenwart von denaturierenden Agenzien, wie Formaldehyd, weil die RNA-Stränge zur Bildung von Sekundärstrukturen neigen und diese das Wanderungsverhalten beeinflussen könnten. Weiterhin wird dem Probenpuffer meist Formamid zugesetzt, deshalb sollte das Gel auf jeden Fall unter einem Abzug laufen. Die aufgetrennte RNA wird dann auf eine Membran geblottet und diese mit einem radioaktiv markierten DNA-Fragment hybridisiert. Auch wenn andere Methoden wie die RT-PCR als sensitiver gelten, so wird der Northern Blot wegen seiner großen Spezifität immer noch gerne angewendet. Im Unterschied zu den im Folgenden dargestellten Methoden wird beim Northern Blot die mRNA nicht durch eine Polymerase in DNA umgeschrieben oder amplifiziert. Deshalb ist die Methode weniger anfällig für experimentelle Fehler. Auf die Möglichkeit, RNA im Gewebe durch *in situ*-Hybridisierungen nachzuweisen, wird im ► Kap. 6.3.3 eingegangen.

Eine weitere Möglichkeit, mRNA-Mengen zu quantifizieren, bietet die RT-PCR (Reverse Transkription-PCR). Zunächst kann man die RT-PCR zum qualitativen Nachweis von mRNA einsetzen. Bei der quantitativen RT-PCR werden zusätzlich zur Probe, die analysiert werden soll, Standards verwendet. Diese sind DNA-Konstrukte, auf welche die Primer ebenfalls passen, aber bei der Amplifikation Banden anderer Größe als die zu quantifizierenden Banden ergeben. Einige Experimentatoren verzichten auf diese Standards. Die Reaktionen werden in einem Agarosegel analysiert. Allerdings gilt diese Methode, die auch als semiquantitativ bezeichnet wird, als nicht sehr zuverlässig.



■ **Abb. 2.8** Prinzip Quantitativen Real-Time-PCR unter Verwendung von TaqMan-Sonden. Wird die Oligonucleotidsonde von der Polymerase freigesetzt, sendet der Reporter ein fluoreszentes Signal aus

Die Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR oder qPCR, die Abkürzung RT-PCR sollte in diesem Zusammenhang vermieden werden) ist eine beliebte Methode, um Nucleinsäuren zu quantifizieren. Allerdings braucht man ein entsprechendes Gerät, da die Amplifikation während der Reaktion verfolgt wird und nicht nach Abschluss der Reaktion auf einem Gel. Sie basiert auf der Detektion von fluoreszenten Signalen, die proportional zum PCR-Produkt während der Amplifikation generiert werden. Eine Möglichkeit besteht darin, einen Farbstoff, der sich unspezifisch an doppelsträngige DNA anlagert und dabei fluoresziert, der Reaktion zuzugeben, z. B. SYBR green I. Die Zunahme der Fluoreszenz ist dann proportional der Menge an doppelsträngiger DNA. Der Vorteil gegenüber anderen qPCR-Methoden ist, dass keine Reporteroligonucleotide verwendet werden und somit nicht gekauft werden müssen. Der Nachteil dieser Methode ist, dass auch unspezifisch amplifizierte PCR-Produkte zu einem Signal führen. Die Spezifität der PCR-Reaktion somit von entscheidender Bedeutung ist.

Eine spezifischere Methode, *TaqMan* genannt, nutzt die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase aus (■ Abb. 2.8). Dem Reaktionsmix wird neben den Gen-spezifischen Primern ein Gen-spezifisches Oligonucleotid zugegeben. Dieses Oligonucleotid ist an seinem 5'- und 3'-Ende mit je einem Fluoreszenzfarbstoff modifiziert. Während der Reaktion wird der Farbstoff am 5'-Ende (der Reporter) angeregt, dieser überträgt die aufgenommene Energie auf den Farbstoff am 3'-Ende (der Quencher). Dadurch wird kein Fluoreszenzsignal ausgesendet. Das Oligonucleotid kann an eine spezifische Sequenz des Templates binden. Wird dieser Bereich durch die Polymerase amplifiziert, so wird aufgrund ihrer 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Reporter freigesetzt und das Oligonucleotid abgebaut. Dadurch sendet der Reporter Fluoreszenzsignale aus. Voraussetzung für das Funktionieren von Reporter und Quencher ist ihre große Nähe. Es wird Energie von einem fluoreszierenden Donormolekül auf ein fluoreszierendes Akzeptormolekül übertragen, dies bezeichnet man auch als *Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer* (FRET) (► Kap. 3). Da die freie Sonde kein Fluoreszenzsignal aussendet, kann diese im Überschuss eingesetzt werden.

Die über die Entkopplung vom Quencher erzeugte Fluoreszenz ist proportional zur Amplifikation des gebildeten Doppelstranges und dient dem direkten Nachweis der Template-Menge.

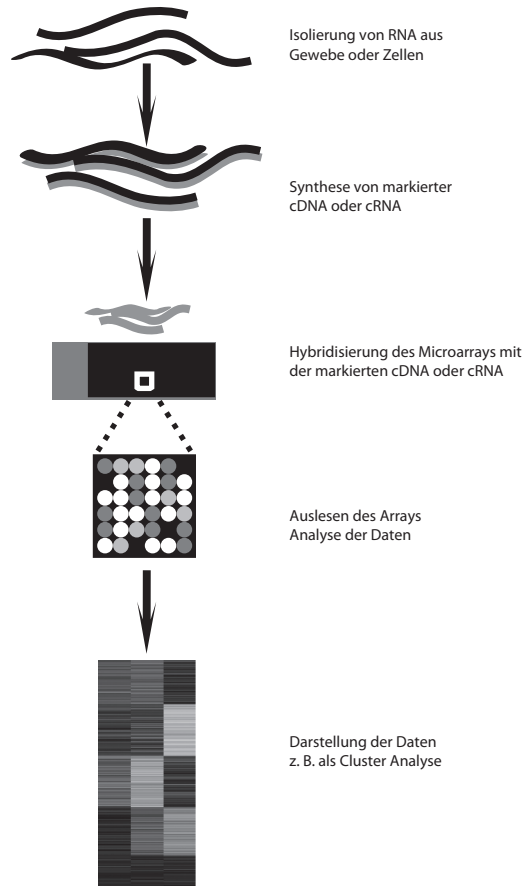
Es gibt weitere Analysesysteme, bei denen andere, modifizierte Reporter-Oligonucleotide verwendet werden. Wird als Ausgangsmaterial mRNA benutzt, so muss diese zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dies ist ein sehr kritischer Schritt, der entweder im gleichen Tube vorgenommen werden kann oder die Reverse Transkription und PCR-Amplifikation finden getrennt statt (Wong und Medrano, 2005). Die qPCR-Anwendungen, Auswahl von Standards und Genen zur Normalisierung der Daten sollte man gut planen. Es sollten mehrere Gene zur Normalisierung verwendet werden. Zu bedenken ist z. B., dass sich beta-Actin nicht in jedem Fall als endogene Kontrolle bei neuronalen Proben eignet, da beta-Actin selbst in Nervenzellen einer großen Dynamik unterliegen kann. Es wurden inzwischen Richtlinien für Publikationen vorgeschlagen, ein Berücksichtigen der Vorschläge kann vor bösen Überraschungen beim Publizieren schützen (Bustin et al., 2009).

■ ■ Einzelzell-PCR

Es gibt die Möglichkeit, Elektrophysiologie und Expressionsanalysen zu kombinieren. Wird eine Einzelzelle gepatched und elektrophysiologisch charakterisiert, so besteht die Möglichkeit, anschließend die Zelle in die Patch-Kapillare einzusaugen, die mRNA zu isolieren und in cDNA zu überschreiben. Man sollte bei der Planung dieser Experimente auf jeden Fall die geringen Mengen mRNA, die aus einer Zelle gewonnen werden können, in Betracht ziehen und eine sehr hohe Frustrationstoleranz besitzen.

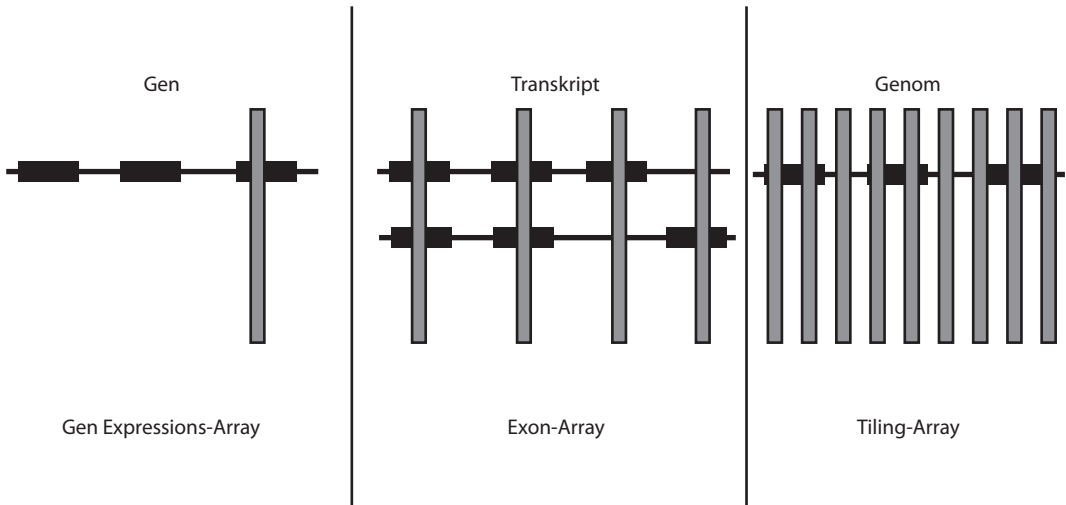
2.10 Microarrays

Microarrays waren lange Zeit *en vogue* und entwickelten sich zum beliebtesten Werkzeug zur genomweiten Expressionsanalyse. Die Technologie eröffnete zum ersten Mal die Möglichkeit das gesamte Transkriptom eines Gewebes zu erfassen.



■ **Abb. 2.9** Ablauf eines Microarray-Experiments. Aus biologischen Proben, Gewebe oder Zellextrakt, wird RNA isoliert und je nach Verfahren in markierte cDNA oder cRNA überschrieben. Unterschiedliche Signalintensitäten werden detektiert und können zwischen verschiedenen Proben verglichen werden. Die Auswertung bedarf einer ausführlichen computergestützten Analyse

Bei der Microarray-Technologie (■ **Abb. 2.9**) oder auch DNA-Chiptechnologie werden Einzelstrangoligonucleotide mit bekannter Sequenz in einem Punktraster auf einen Chip gespottet. Die Oligonucleotide haben meist eine Länge von 20–25 bp, können aber auch länger sein und sind mit einer sehr hohen Dichte (im Extremfall mehr als 200 000 pro cm²) auf den Chip gepackt. In den seltensten Fällen stellt der Experimentator den Chip selbst her, meist steht auch kein Microarray-Scanner im Labor zur Verfügung, sondern eine Service-Unit stellt diesen. Dadurch müssen Sie sich an die vorgegebene Versuchsanordnung anpassen. Vom



■ **Abb. 2.10** Beispiele unterschiedlicher Microarray-Typen. Ziel kann die Detektion der Expression einzelner Gene sein, unterschiedliche Gentranskripte oder die Erfassung des gesamten Genoms und somit auch unbekannter Transkripte. In schwarz sind Gene schematisch dargestellt, Exons als Kästchen, Introns als Linie. Die grauen Balken zeigen, an welcher Stelle Probesets mit dem Genom übereinstimmen

Scanner hängen auch die Wahl der Hybridisierungs sonden und deren Markierung ab. Man kann sowohl DNA- als auch RNA-Sonden verwenden. Zu bedenken ist, dass die Oligonucleotide auf dem Chip DNA-Moleküle sind und eine RNA/DNA-Hybridisierung stabiler ist als ein DNA/DNA-Hybridisierung, und deshalb unter stringenteren Bedingungen wie z. B. höheren Temperaturen ablaufen kann. Bei vielen kommerziellen Microarrays werden Oligonucleotide mehrfach gespottet. Diese werden auch als Probesets bezeichnet und ein Gen wird meist durch mehrere Probesets repräsentiert. Zur weiteren Kontrolle werden neben diesen *perfect match*-Oligonucleotiden auch so genannte *mismatch*-Oligonucleotide verwendet, die sich nur in einzelnen Nucleotiden unterscheiden. Aus dem Hybridisierungsmuster kann dann die Spezifität abgeleitet werden. Weiterhin ist zu beachten, dass in der Regel nur die komplementäre Sequenz mit den Oligonucleotiden hybridisiert werden kann. Somit muss das Endprodukt der Markierung cRNA oder cDNA sein. Markiert werden kann radioaktiv, fluoreszent oder mit Haptenen wie Biotin oder Digoxigenin. Aber wie schon erwähnt, haben Sie häufig keine Wahl. Entscheiden Sie sich z. B. für die Technologie der Firma Affymetrix, so müssen Sie eine Biotin-Markierung verwenden. Die Hybridisierung wird dann in Abhängigkeit vom verwen-

deten System detektiert. Anschließend erfolgt die Auslese des Microarrays. Im Gegensatz zur qPCR wird hier nicht die dynamische Hybridisierung verfolgt, sondern nur das Endergebnis der Hybridisierung erfasst. Die folgende bioinformatische Analyse ist der Schlüssel zur richtigen Interpretation der Ergebnisse.

Man kann Microarrays in unterschiedliche Gruppen einteilen (■ Abb. 2.10). Ein Typ zielt darauf ab, die Expression bestimmter Gene und spezifische Modifikationen dieser Genen nachzuweisen. Eine weitere Möglichkeit bieten Exon Arrays, die unterschiedliche Exons erfassen und so die Expression unterschiedlicher Splicevarianten nachweisen können. Während sich die beiden zuerst genannten Arraytypen auf bekannte, bereits klonierte cDNA-Sequenzen beziehen, versuchen die so genannten Tiling Arrays die Komplexität des Transkriptoms ohne Vorannahmen zu erfassen. Weiterhin ist es möglich, auch nicht-polyadenylierte RNAs mit dieser Methode zu detektieren. Bei den Tiling Arrays decken Oligonucleotide gleichmäßig das Genom ab. Der Abstand zwischen den Oligonucleotiden kann variieren, wird aber möglichst gering gehalten. Nur repetitive Sequenzbereiche des Genoms werden üblicherweise nicht präsentiert. Der Nachteil der Tiling Arrays ist, dass selbst modernste Methoden es nicht ermöglichen, alle Probesets auf

einem Chip zu vereinigen. In der Regel braucht man mehrere Chips, um das gesamte Genom auf diese Weise abzudecken. Zum Vergleich: Ein Array reicht aus, um das gesamte bekannte Transkriptom der Maus abzudecken. Dabei werden mehr als 45 000 Probesets gespottet, die wiederum mehr als 30 000 Transkripte repräsentieren. Allerdings ist es sehr wahrscheinlich, dass nicht alle Splicevarianten aller Gene durch solche Arrays erfasst werden. Die Verwendung von Tiling-Arrays erhöht diese Wahrscheinlichkeit.

Ermittelt werden bei Microarray-Experimenten relative Signalstärken, eine absolute Quantifizierung der Expression ist nicht gegeben. Auf die Identifizierung von Genen, die unterschiedlich exprimiert sind, muss unbedingt eine Validierung der Ergebnisse erfolgen. Hierfür wird gerne die veränderte Expression einzelner Gene durch qPCR überprüft. Es können aber auch *in situ*-Hybridisierungen oder Northern Blots zur Bestätigung durchgeführt werden. Als alternative Methode zur genomweiten Analyse der Transkription scheint sich das *Next Generation Sequencing* (siehe oben) zu etablieren. Im Gegensatz zu den Microarrays basieren die Ergebnisse nicht auf zuvor bekannten Sequenzen, die auf die Chips aufgebracht werden, sondern auf die schnelle und parallele Sequenzierung von DNA-Fragmenten, die auch unbekannter Natur sein können. Man sollte je nach Experiment und Möglichkeiten (nicht jedem steht ein Microarray-Scanner oder ein entsprechender Sequencer zur Verfügung) prüfen, welches die bessere Methode zur Transkriptom-Analyse ist. Beide Verfahren verlangen eine aufwendige Vorbereitung sowie eine aufwendige bioinformatische Analyse und Interpretation.

2.11 RNA-Interferenz (RNAi)

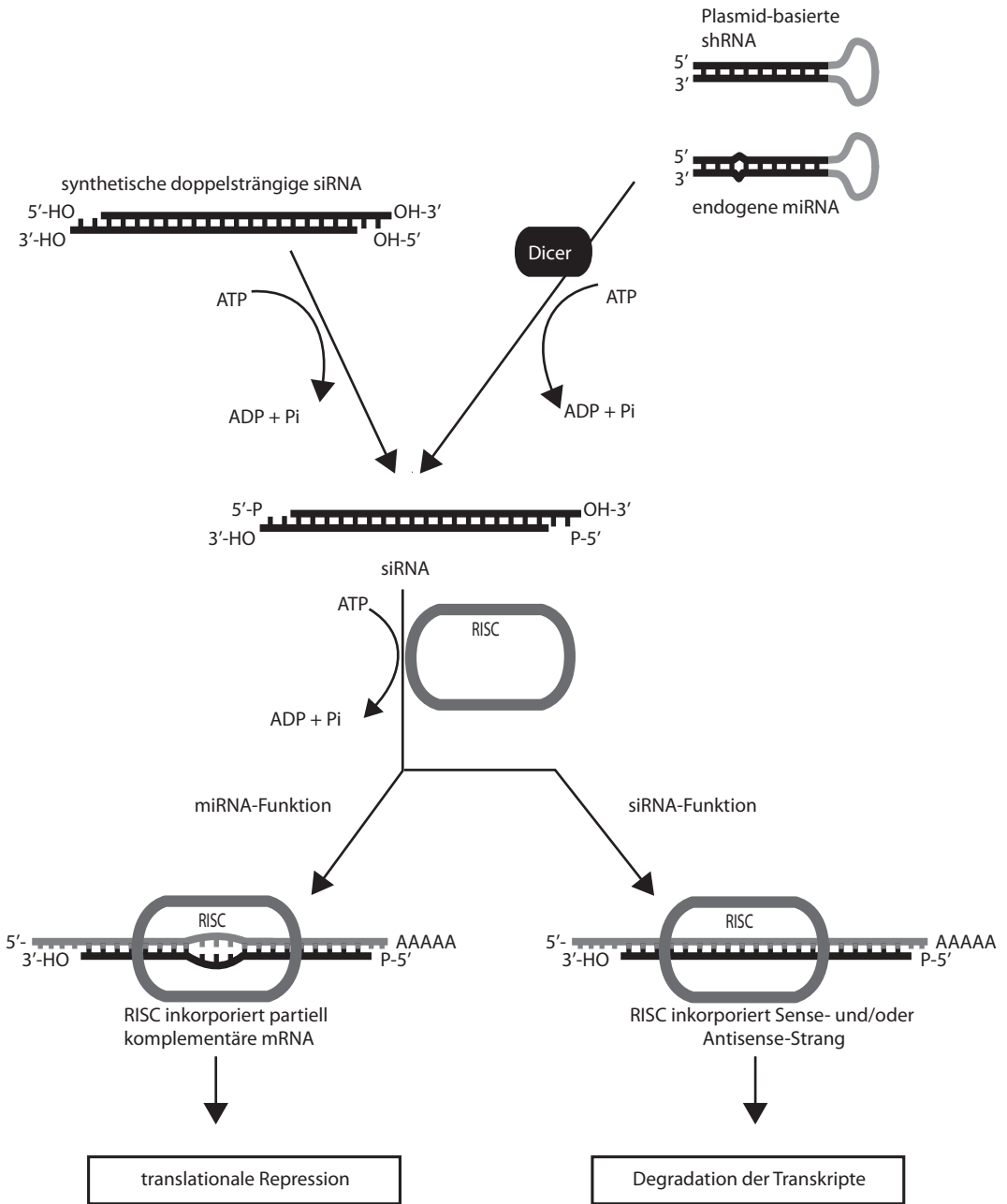
Es wurden in der Vergangenheit drei Nucleinsäurebasierte Verfahren entwickelt, um posttranskriptionell die Genexpression zu unterdrücken. Diese basieren entweder auf *antisense*-Oligonucleotiden, Ribozymen oder RNA-Interferenz (RNAi).

Antisense-Oligonucleotide sind in der Regel ca. 20 Nucleotide lange DNA-Einzelstränge. Diese führen in Zellen durch die Hybridisierung an mRNA zum Abbau durch Ribonuclease H, einem Enzym, das spezifisch RNA-DNA-Duplexe abbaut.

Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle, die Ziel-RNA durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen binden und die Hydrolyse des Phosphodiester-Rückgrats der RNA katalysieren. Sowohl beim Benutzen von Antisense-Oligonucleotiden als auch von Ribozymen müssen relativ hohe Konzentrationen gewählt werden, um einen zuverlässigen Effekt zu erzielen. Die hohen Konzentrationen bedingen leider auch, dass unspezifische Nebeneffekte sehr häufig auftreten. Im Gegensatz dazu sind zum Reduzieren der Genexpression mittels RNA-Interferenz (RNAi) relativ geringe Konzentrationen von siRNA (*small interference RNA*) notwendig. Dies führt zu geringeren unspezifischen Effekten. Obwohl die Technik, mittels siRNA experimentell RNAi zu induzieren, nicht unproblematisch ist und viele Tücken birgt, so ist sie momentan die dominierende Anwendung zur posttranskriptionellen Gensuppression.

Unter RNAi versteht man einen Prozess, bei dem durch doppelsträngige RNA die Expression einzelner Gene vermindert wird. Erfolgt dies experimentell, so bezeichnet man den Vorgang auch als *RNA knockdown* oder *RNA silencing*. RNAi wird durch kurze, nichtcodierende RNAs vermittelt. Diese können endogenen Ursprungs sein und werden *micro RNA* (miRNA) genannt oder können experimentell eingeführt werden. Dann werden sie als siRNA oder shRNA bezeichnet. RNAi vermindert die Genexpression auf der posttranskriptionellen Ebene, und ihre Spezifität wird durch Sequenz-komplementarität vermittelt.

Die ersten Experimente, die zur Entdeckung von RNAi führten, wurden an Pflanzen (Petunien) und Wirbellosen (vor allem Nematoden) durchgeführt. Darauf folgte die Anwendung in Säugetieren, sowohl in kultivierten Zellen als auch ganzen Organismen. Die Schlüsselkomponenten der RNAi-vermittelten Gensuppression sind konserviert und in Wirbeltieren scheinen miRNAs wichtige Elemente zur Regulation der Genexpression zu sein. Allerdings zeigte sich, dass es auch Unterschiede in der Vermittlung der Effekte zwischen den verschiedenen Organismengruppen gibt. Eine wichtige Funktion der natürlichen endogenen miRNA beinhaltet bei den meisten Tieren die virale Abwehr. In Säugetieren wird diese Funktion jedoch von anderen molekularen Mechanismen, wie der antiviralen Interferon-Antwort, übernommen. Diese wird z. B.



■ **Abb. 2.11** RNAi-vermittelter Gen-Knockdown in Säugetieren. Die Prozessierung von *hairpin* miRNAs oder plasmid-basierter shRNA durch das Enzym Dicer führt zur Formation von siRNAs. Diese und synthetische siRNAs werden durch endogene Kinasen am 5'-Ende phosphoryliert. Die so aktivierten siRNAs assoziieren mit zellulären Proteinen und formen den RNA-induced silencing complex (RISC). Im Idealfall vermittelt der Antisense-Strang das RISC-abhängige Schneiden einer spezifischen Ziel-mRNA. Theoretisch kann aber auch der Sense-Strang eine Prozessierung vermitteln. Paart die siRNA nicht perfekt an eine Ziel-mRNA, so kann dies zu einer Unterdrückung der Translation führen

bei der Aufnahme von doppelsträngiger RNA, die mehr als 30 bp lang ist, aktiviert. Sie vermittelt dann den Abbau sämtlicher RNAs und führt am Ende zum Zelltod. Obwohl RNAi in Säugetieren nicht der viralen Abwehr dient, konnte der Prozess in Säugetieren mit doppelsträngiger RNA, die kürzer als 30 bp sind, nachgewiesen werden.

Der Mechanismus der RNAi-vermittelten Gen-suppression in Säugetieren ist in **Abb. 2.11** dargestellt. Sowohl endogene miRNA als auch plasmidbasierte shRNA wird durch das evolutionär konservierte Enzym Dicer in 21–28 Nucleotide lange Fragmente geschnitten. Diese oder auch synthetische doppelsträngige siRNA werden in einem Proteinkomplex (*RNA-induced silencing complex*, RISC) in Einzelstränge überführt. Mit Hilfe von RISC paaren die siRNA-Einzelstränge mit komplementären mRNA-Transkripten der Zelle, die auch als Ziel-mRNA bezeichnet werden. Es gibt nun zwei Möglichkeiten, entweder die Stränge sind vollständig oder nur partiell komplementär. Eine Endoribonuclease schneidet die gepaarten RNA-Stränge, die vollständig komplementär sind, also perfekt zueinander passen. Dadurch kann die entsprechende mRNA nicht mehr in ein Protein translatiert werden. Es kommt also zu einem Sequenz-spezifischen Abbau von komplementärer RNA (siRNA-Funktion) (**Abb. 2.11**). Bei Säugetieren paaren miRNAs jedoch auch mit partiell komplementärer mRNA, dies führt nicht zum Schneiden der Ziel-mRNA, sondern lediglich zur Inhibition der Translation (miRNA Funktion). Dies bedingt, dass experimentell applizierte siRNA nicht nur die vollständig komplementäre Ziel-mRNA erkennt, sondern auch an ähnliche mRNA bindet und die Translation dieser mRNA inhibieren kann. Man spricht hierbei von *Off-Target-Effects*. Diese gelten als sehr schwer zu kontrollieren, insbesondere, weil dieses weniger spezifische Binden schwer vorher-sagbar ist. Mögliche Faktoren, die eine solche Paarung beeinflussen, sind bisher nicht klar definiert. Außerdem wird vermutet, dass es kooperative Effekte gibt und mehrere miRNAs, die nicht-perfekt an eine Ziel-mRNA paaren, zur vollständigen Inhibition der Translation nötig sind.

Experimentell gibt es zwei Möglichkeiten, einen RNAi-vermittelten Knockdown zu induzieren. Die Applikation von siRNA, also kurzen doppelsträn-

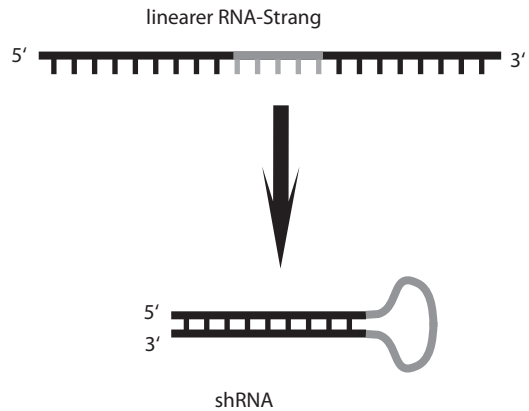


Abb. 2.12 *Short hairpin* RNA (shRNA). Ein shRNA-Molekül besteht aus zwei komplementären Sequenzen, die durch einen kurzen Spacer getrennt sind. Das Molekül faltet sich selbst und besitzt eine Haarnadelstruktur

gigen RNA Molekülen, oder das Einbringen eines Vektors, der die entsprechenden RNA-Sequenzen auf einem Transkript vereinigt (**Abb. 2.12**). Da in diesem Transkript die beiden komplementären Sequenzen durch einen Spacer voneinander getrennt sind, bildet sich eine Haarnadelstruktur (*hairpin*) aus und wird deshalb als *short hairpin* (shRNA) bezeichnet (**Abb. 2.12**).

Zellen können sowohl mit siRNA als auch einem shRNA-Vektor transfiziert werden. siRNA wird in der Regel durch eine Liposomen-basierte Transfektion in Zellen eingebracht. shRNA-Vektoren können mittels aller zur Verfügung stehenden Transfektionsmethoden in Zellen gebracht werden; es gibt auch Strategien, die Vektoren stabil in das Zellgenom zu integrieren und so einen dauerhaften Knockdown zu erreichen. Auf die verschiedenen Möglichkeiten, Zellen zu transfizieren, als auch auf RNAi *in vivo*-Anwendungen wird in späteren Kapiteln eingegangen. An dieser Stelle möchten wir aber einige Vor- und Nachteile der verschiedenen Knockdown-Strategien nennen. Es hängt natürlich von der Fragestellung, die der Experimentator behandelt ab, welches die geeignete Methode zum Knockdown ist. Der Vektor-basierte shRNA-Ansatz hat den Vorteil, dass keine spezielle Transfektionsmethode etabliert werden muss, es wird genau wie beim Transfizieren anderer Plasmide verfahren. Es besteht die Möglichkeit, die Expression eines Gens dauerhaft zu unterdrücken, indem man

entsprechende stabile Zelllinien oder Organismen herstellt. Außerdem kann man Vektoren verwenden, die eine induzierbare Expression ermöglichen. Nachteile gibt es aber leider auch. Häufig wird bei zu hoher Expression der shRNA die Interferonantwort aktiviert, wodurch die Zellen absterben. Wählt man den siRNA-basierten Ansatz, so kann man unspezifische Nebeneffekte aufgrund zu hoher Konzentrationen besser kontrollieren, da die applizierte Konzentration genau eingestellt werden kann. Weiterhin sind chemische Modifikationen sehr leicht bei den synthetisch hergestellten siRNAs anzufügen. Der Nachteil von siRNAs besteht in der kurzen Dauer des Knockdowns.

Man sollte beim Designen von siRNAs und shRNAs einigen Regeln folgen. Die gewählte Sequenz sollte spezifisch sein, analysieren Sie mit Hilfe von BLAST, ob andere Gene mit dieser Sequenz homolog sind. Die Spezifität sollte für beide Stränge überprüft werden. Der GC-Gehalt sollte unter 50% liegen. Vermeiden Sie Intronsequenzen, 5'- und 3'-UTRs und die ersten 74 Basen nach dem Startcodon. Empfohlen werden in der Regel 21 Nucleotide lange Sequenzen, die am 3'-Ende einen 2 Nucleotide Überhang haben. Einige Experimentatoren raten zur Verwendung von 2-Desoxythymidinen für diesen Überhang. Eine weitere Regel schlägt vor, dass am 5'-Ende mit zwei Adenosinen begonnen wird. Allerdings geben diese Regeln keine Garantien, dass es zum Knockdown kommt bzw. dass dieser nur das relevante Gen betrifft. Zu bedenken ist ebenfalls, dass Sequenzen, die als siRNA zu einem erfolgreichen Knockdown führen, nicht unbedingt als shRNA funktionieren und umgekehrt.

Kontrollen sind natürlich extrem wichtig. Es sollte nicht nur nachgewiesen werden, dass eine spezifische mRNA nicht mehr vorhanden ist. Viel wichtiger ist, dass zu dem Zeitpunkt des Experiments das relevante Protein nicht mehr nachzuweisen ist, denn in der Regel untersucht man dessen Funktion. Häufig wird eine *scrambled*-Kontrolle verwendet. Dies ist eine siRNA mit gleicher Nucleotidzusammensetzung, aber mit einer anderen zufälligen Sequenz. Diese Kontrolle kann zwar zeigen, dass eine verwandte siRNA nicht den gleichen Effekt hat, kann aber *off-target*-Effekte nicht ausschließen. Deshalb werden häufig drei siRNAs, die spezifisch für unterschiedliche Regionen eines

Gens sind, designed, um identische Effekte zu zeigen. Arbeiten Sie allerdings mit einem Gen, welches viele homologe Gene besitzt, weil es z.B. zu einer großen Genfamilie gehört, so können Sie häufig nicht 3 spezifische und vielversprechende Sequenzen finden.

Experimente sollten auf jeden Fall (wie immer!!!) mehrfach wiederholt werden. Die ultimative Kontrolle ist ein Vektor, der das Gen, das ausgeschaltet werden soll, in modifizierter Form trägt, so dass es nicht mit der siRNA paart. Wird dieses gemeinsam mit der siRNA appliziert, sollte der Knockdown-Effekt aufgehoben sein. Allerdings kann auch solch ein *Rescue* aufgrund von technischen Problemen scheitern, z. B. weil die Expression durch den Vektor nicht physiologisch ist.

Bei einem RNAi-Screen wird eine große Anzahl von verschiedenen siRNAs appliziert und ihre Effekte untersucht. So können nicht nur siRNA-Moleküle, die einen spezifischen Effekt haben, identifiziert werden, sondern weitere Gene, die mit diesen paaren.

Für viele Gene sind funktionierende siRNAs oder shRNAs bekannt, es lohnt sich, auf diese für einzelne Experimente zurückzugreifen. Wer charakterisierte siRNAs oder shRNAs nutzen möchte, sollte aber beachten, dass in jedem Gewebe oder Zellverband die Wirkung prinzipiell anders sein kann. Viele Firmen bieten RNAi-nahe Dienstleistungen an. Dies reicht von der Synthese von siRNA bis hin zu fertigen Viruspartikeln zur Transfektion mit shRNA. Einige Firmen stellen ihre Vorhersagemethoden zur Verfügung, allerdings sind die Vorhersageparameter in der Regel nicht ersichtlich. Oft haben Firmen auch komplette shRNA-Sätze für ein Gen im Programm. Einige Anbieter gehen so weit, dass sie die Sequenzen, die für den Knockdown verwendet werden sollen, nicht einmal preisgeben. Auf diese sollte man aber bestehen, denn sonst fischt man wirklich im Trüben. Weiterhin sollten die angebotenen Sequenzen zusätzlich vom Experimentator selbst überprüft werden, denn vielfach stellen sich die angebotenen Werkzeuge als nicht sehr spezifisch heraus.

Literatur und World-Wide-Web-Links

Web Ressourcen:

Allgemeine Links zu diversen biologischen und molekular biologischen Seiten/Ressourcen:
http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/BioNet/Pedro/research_tools.html

Restriktions Enzyme:

<http://www.neb.com/nebecomm/default.asp>
<http://www.fermentas.com/en/products/all/conventional-restriction-enzymes>

Restriktionsschnittstellen:

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>
<http://rebase.neb.com/rebase/>
<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>

Vektoren, Plasmide, cDNAs:

<http://www.addgene.org/> (Ein Nonprofit-Plasmid Archiv für Wissenschaftler)

Firmen die Vektoren anbieten:

<http://www.imagenes-bio.de/>
<http://www.clontech.com/>
<http://www.invitrogen.com/>
<http://www.stratagene.com/>
<http://www.genecopoeia.com/> (wird in Deutschland über ImaGenes vertrieben)
<http://www.origene.com/> (wird in Deutschland über AMS Biotechnologie vertrieben)

PCR-Primerdesign:

<http://biotools.umassmed.edu/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
<http://molbiol-tools.ca/PCR.htm>

Sequenzanalysen:

BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
 Ensembl: <http://www.ensembl.org/>

Expressionsanalysen:

MGI: <http://www.informatics.jax.org/>
 GEO: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>
 UniGene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>
 Allen Brain Atlas: <http://mouse.brain-map.org/>
 Embl-Atlas: <http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/atlas/>
 GENSAT: <http://www.gensat.org/index.html>

Real-time PCR:

<http://realtimpcr.dk/>
<http://www.gene-quantification.info/>

Microarrays:

Microarray Gene Expression Database: <http://www.mged.org>
 Minimal Information About a Microarray Experiment: <http://www.mged.org/Annotations-wg/index.html>
 Microarray and Gene Experiment: <http://www.mged.org/mage>
 miRNA: <http://www.mirbase.org/>

Allgemein:

Mülhardt C (2006) Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics, 5. Aufl, Spektrum Akademischer Verlag

Sambrook ER, Russel DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Rekombinase Systeme:

Park J, LaBear J (2006) Recombinational Cloning. *Curr. Prot. Mol. Biol.* 3.20.1–3.20.22

Mutagenese:

Chiu J, March PE, Lee R, Tillet D (2004) Site-directed, ligase-independent mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h. *Nucleic Acid Res.* 32, 1–5.

Real-Time PCR:

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. (2009) The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.

Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 39, 75–82.

Microarrays:

Müller HJ, Röder T (2004) Der Experimentator: Microarrays, 1. Aufl, Spektrum Akademischer Verlag

miRNA/siRNA:

Dorsett Y, Tuschl T (2004) siRNAs: Applications in functional genomics and potentials as therapeutics. *Nature Rev. Drug Discovery*, 3, 318–329

Mittal V (2004) Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nature Rev. Genetics*, 5, 355–365.

Wang Z. (2009) MicroRNA Interference Technologie, Springer Verlag