

## 4 Methoden

### 4.1 Präparation und Kultivierung von Endothelzellen

#### 4.1.1 Präparation von Hirnkapillarendothelzellen

Dextranlösung: 15 % (w/v) in Earle's Puffer

Collagenase-D/TLCK-Lösung: 8 mg/ml Collagenase-D  
0,8 mg/ml TLCK  
in M199-Medium

Collagenase-D-Lösung: 8 mg/ml Collagenase-D in M199-Medium

Erythrocyten-Lysepuffer: 20 % (v/v) Lösung A:

660	mM	NH <sub>4</sub> Cl
25	mM	KCl
4	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,88	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,5	% (w/v)	Glucose

5 % (v/v) Lösung B:

20,7	mM	MgCl <sub>2</sub>
5,7	mM	MgSO <sub>4</sub>
30	mM	CaCl <sub>2</sub>

5 % (v/v) Lösung C:

168	mM	NaHCO <sub>3</sub>
-----	----	--------------------

Die Isolierung von Hirnkapillarendothelzellen wurde erstmals von Bowman et al. (1981) beschrieben und beruht auf einer zweistufigen, enzymatischen Freisetzung der Endothelzellen aus der Gefäßmatrix und anschließender Dichtegradienten-Zentrifugation. Im ersten enzymatischen Schritt macht man sich den relativ geringen Anteil von Kollagen in der extrazellulären Matrix des Kapillarrohres zunutze. Mit der unspezifischen Protease Dispase wird die extrazelluläre Matrix fast vollständig abgebaut, während die Blutgefäße, die durch eine kollagenhaltige Basalmembran geschützt sind, unversehrt bleiben. Im zweiten enzymatischen Schritt wird die Basalmembran durch Collagenase-D abgebaut, was zu einer

sukzessiven Freisetzung der Endothelzellen führt. Das hier verwendete Protokoll folgt unter Modifikationen der von Mischeck (1989) beschriebenen Methode. Um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle verwendeten Lösungen autoklaviert und Glasgeräte bei 180°C im Trockenschrank sterilisiert.

Für die Präparation wurden 10 Hirne aus frisch geschlachteten Schweinen entnommen und in Earle's-Puffer auf Eis direkt ins Labor transportiert. Die Hirne, die schlachtungsbedingt als Hälften vorlagen, wurden einmal mit Earle's Puffer gewaschen, von Hirnhaut, Kleinhirn, Plexus choriodeus und äußeren Blutgefäßen befreit und die Cortices mit einer Rasierklinge zerkleinert und in M199-Medium suspendiert. Bis zur vollständigen Verarbeitung aller Hirnhälften wurde die Suspension langsam auf einem Magnetrührer gerührt und anschließend das Gewicht des Gewebes bestimmt.

Pro Gramm Gewebe wurden 5 mg Dispase in insgesamt 40 ml M199-Medium gelöst, mit der Gewebesuspension vereinigt und das Volumen durch Zugabe von M199-Medium auf 800 ml erhöht. Der Ansatz wurde halbiert und beide Hälften jeweils 3 h bei 37°C gerührt. Anschließend wurden je 100 ml Zellsuspension mit 100 ml steriler Dextranlösung in einem 250 ml Zentrifugenbecher vereinigt und 10 min kräftig geschüttelt. Zum Sedimentieren der Kapillaren wurde 10 min bei 7500x g und 10°C zentrifugiert (Beckmann JA -14-Rotor).

Nach Dekantieren des Überstandes und Entfernen fetthaltiger Gewebereste wurden die Kapillaren in je 7,5 ml M199-Medium resuspendiert, jeweils 4 Suspensionen in einer Spinnerkulturflasche vereinigt und mit 2,5 ml Collagenase-D/TLCK-Lösung, sowie 7,5 ml M199-Medium versetzt, so dass eine Konzentration von 0,5 mg/ml Collagenase-D bzw. 0,05 mg/ml TLCK erhalten wurde. Jeder Ansatz wurde 2 h 15 min bei 37°C langsam gerührt. Nach 1 h wurden jeweils 8 µl Benzonase ( $\geq 25$  U/µl) zugegeben und die Collagenase-D Konzentration durch Zugabe von 2,5 ml Collagenase-D Lösung auf 1 mg/ml erhöht.

Zum Beenden der enzymatischen Reaktion wurden die in der Kollagenaselösung freigesetzten Zellen in 50 ml Reaktionsgefäße überführt, durch Zentrifugation sedimentiert und der vereinigte Ansatz mit 40 ml M199-Medium bei Raumtemperatur gewaschen (Tischzentrifuge, 110x g, 5 min).

Das Sediment wurde mit M199-Medium auf ein Volumen von 6 ml eingestellt und jeweils 1 ml der Zellsuspension auf einen vorbereiteten Percoll-Dichtegradienten aufgetragen.

Zur Herstellung des Dichtegradienten wurden 9,91 ml Percoll, 0,72 ml 10fach konzentriertes M199-Medium und 19,4 ml Earle's Puffer in SW-28 Zentrifugenröhrchen gegeben und

für 1 h bei 32700x g und 4°C mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert (Sorvall Ti-70-Rotor). Die Röhrchen wurden mit Metallschraubkappen verschlossen um ein Kollabieren der Gefäße während der Zentrifugation zu verhindern.

Das Sedimentieren der Zellsuspension im Dichtegradienten erfolgte für 10 min bei 1500x g und 4°C mit ausgeschalteter Bremse (Sorvall SW-28-Rotor). Die Endothelzellen wurden hierbei als voluminöse mittlere Bande angereichert und konnten von den eine untere, scharfe Bande bildenden Erythrocyten und einer oberen fettreichen Schicht getrennt werden.

Die Endothelzellen wurden mit einer Plastikpipette vorsichtig abgezogen, vereinigt und zweimal mit 40 ml M199-Medium gewaschen (Tischzentrifuge, 110x g, 5 min).

Um Erythrocyten, die durch die Dichtegradienten-Zentrifugation nicht vollständig von den Endothelzellen getrennt werden konnten, zu entfernen, wurde das Zellsediment in 4 ml Erythrocyten-Lysepuffer und 2 ml Earle's Puffer vorsichtig resuspendiert und 5 min in Eis inkubiert. Anschließend wurde zweimal in 40 ml Earle's-Puffer gewaschen (Tischzentrifuge, 110x g, 5 min), das Sediment in 5 ml Earle's Puffer resuspendiert und die Vollständigkeit der Erythrocyten-Lyse mit der Benzidin-Färbung (4.1.4) überprüft.

#### **4.1.2 Zellzahlbestimmung**

Trypanblaulösung: 4 % (w/v) in PBS

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte in einer Thoma-Zählkammer mit Kleinstquadraten der Dimension  $0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$ . Eine Abschätzung der Zellvitalität erfolgte durch Ausschlussfärbung mit Trypanblau. Dafür wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 20  $\mu\text{l}$  Trypanblaulösung versetzt und vor der Zellzählung 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert.

#### **4.1.3 Überprüfung der Zellvitalität**

Die Überprüfung der Vitalität von Endothelzellen erfolgte über eine Anfärbung der Zellen mit Fluorescein-diacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI).

- FDA-Stammlösung: 5 mg/ml in Aceton p.a., bei 4°C im dunkeln lagern  
FDA-Arbeitslösung: Stammlösung 1:500 in PBS verdünnt  
PI-Stammlösung: 5 mg/ml Propidiumiodid in H<sub>2</sub>O, bei 4°C im dunkeln lagern  
PI-Arbeitslösung: Stammlösung 1:10 in PBS

Für die Färbung wurden 20 µl Zellsuspension in Earle's Puffer mit 4 µl FDA-Arbeitslösung und 2 µl PI-Arbeitslösung vorsichtig gemischt und 10 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert.

In vitalen und metabolisch aktiven Zellen wird FDA zu Fluorescein umgesetzt. Diese Zellen erscheinen unter UV-Licht grün. Bei apoptotischen oder toten Zellen wird der Kern durch Propidiumiodid angefärbt, wodurch diese Zellen rot fluoreszieren.

Die Vitalität wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops abgeschätzt.

$$\text{Vitalität} = [(\text{Zahl der lebenden Zellen}) / (\text{Gesamtzellzahl})] \times 100 \%$$

#### 4.1.4 Benzidin-Färbung von Erythrozyten

Benzidin-Stammlösung: 3 % (w/v) Benzidin  
90 % (v/v) Essigsäure

Benzidin-Färbelösung: 40 µl Benzidin-Stammlösung  
20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 % (v/v)  
240 µl H<sub>2</sub>O

Die Benzidin-Färbung ist ein empfindlicher Nachweis für Erythrozyten. Die Reaktion beruht auf der Oxidation von Benzidin (4,4'-Diamino-biphenyl) durch Hämoglobin in Gegenwart von Wasserstoffperoxid.

Für die Färbung wurden 50 µl Zellsuspension in Earle's Puffer und 50 µl Benzidin-Färbelösung vermischt. Unter dem Lichtmikroskop zeigen Erythrocyten eine blaugrüne bis blaue Verfärbung.

#### 4.1.5 Präparation und Kultivierung von Aortaendothelzellen

<u>Gelatinelösung:</u>	1 % (w/v) in H <sub>2</sub> O
<u>Trypsin/EDTA:</u>	0,05 % (w/v) Trypsin 0,02 % (w/v) in PBS
<u>Kulturmedium:</u>	DMEM/Ham's F-12 ohne L-Glutamin 20 % (v/v) FBS, hitzeinaktiviert 10 U/ml Nystatin 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 5 mM HEPES 2 mM L-Glutamin 5 mM TES

Porcine Aortaendothelzellen wurden von M. Cattaruzza (Universität Göttingen, Abteilung für Cardiovasculäre Physiologie) präpariert (Cattaruzza et al., 2000) und für die weitere Kultivierung zur Verfügung gestellt.

Das Wachstum fand in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> bei 37°C in gelatinierten 75-cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit jeweils 10 ml Medium statt. Ein Medienwechsel wurde alle 2 - 3 Tage vorgenommen.

Die Beschichtung der Zellkulturflaschen mit Gelatine erfolgte durch Inkubation von 5 ml Gelatinelösung in den Zellkulturflaschen bei 37 °C im Brutschrank für 30 min. Danach wurde die Lösung abgezogen und die Flaschen mit PBS gewaschen.

Eine Passage der Zellen erfolgte nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens, im Abstand von etwa 4 - 5 Tagen. Um abgestorbene Zellen, Zelltrümmer und Reste verbrauchten Mediums zu entfernen, wurde der Zellrasen vor jeder Passage mit 10 ml PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen vom Gefäßboden erfolgte durch Zugabe von 3,5 ml Trypsin/EDTA und wurde mit dem Mikroskop verfolgt. Nach dem Ablösen der ersten Zellen wurde der Überstand abgezogen und die Trypsinierung durch Zugabe von 8 ml Medium abgestoppt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt, sedimentiert (Heraeus-Zentrifuge, 110x g, 10 min) und in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Zum Ansetzen der

Folgekulturen wurden die Zellen im Verhältnis 1 zu 3 mit Medium verdünnt und in frische Kulturflaschen überführt.

Kulturmedium, PBS und Trypsin/EDTA-Lösungen wurden vor der Verwendung auf 37°C vorgewärmt.

Vor der Ernte wurde der konfluente Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden nach erneuter Zugabe von 10 ml PBS mit Hilfe eines Zellschabers von der Gefäßwand abgelöst, in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und sedimentiert (Heraeus-Zentrifuge, 110x g, 10 min).

## 4.2 Proteinanalytik

### 4.2.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Das Verfahren beruht auf der Färbung von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blau G250. Der Farbstoff bindet hauptsächlich an basische Aminosäuren, wobei sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Die Proteinkonzentration einer Probe kann demnach durch Messung der Absorptionsänderung bei 595 nm und Vergleich mit einem analog behandelten Proteinstandard ermittelt werden.

Für die Proteinbestimmungen wurde das vorgefertigte Reagenz Roti-Quant verwendet, das den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 unter Zusatz von Ethanol und  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , gelöst in  $\text{H}_2\text{O}$  enthält. Die Lösung wurde vor Gebrauch im Verhältnis 1 zu 5 mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und durch einen Faltenfilter filtriert.

In einer Plastikkuvette wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  Probe, Proteinstandard oder Aufschlusspuffer als Referenz mit 1 ml Roti-Quant-Lösung vermischt. Die Ansätze wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Absorption bei 595 nm gemessen. Der Absorptionswert des Referenzpuffers wurde von den Werten der Proben abgezogen und die Proteinkonzentration anhand einer seriellen BSA-Verdünnungsreihe (0,1 bis 1 mg/ml in Aufschlusspuffer) ermittelt.

Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

### 4.2.2 Acetonfällung von Proteinen

Die Fällung von Proteinen erfolgte durch Zugabe von 5 Volumenanteilen 90 % (w/v) Aceton (vorgekühlt auf  $-20^\circ\text{C}$ ) und Inkubation über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$ . Die ausgefallenen Proteine wurden 10 min in der Tischzentrifuge sedimentiert und 3 h an der Luft getrocknet.

### 4.2.3 Zellaufschluss und Proteinfractionierung

Für den fraktionierenden Aufschluss von Endothelzellen wurden modifizierte Methoden von Ramsby und Makowski (1999) und Bordier (1981) kombiniert. Eine Übersicht gibt Abbildung. 4.1.

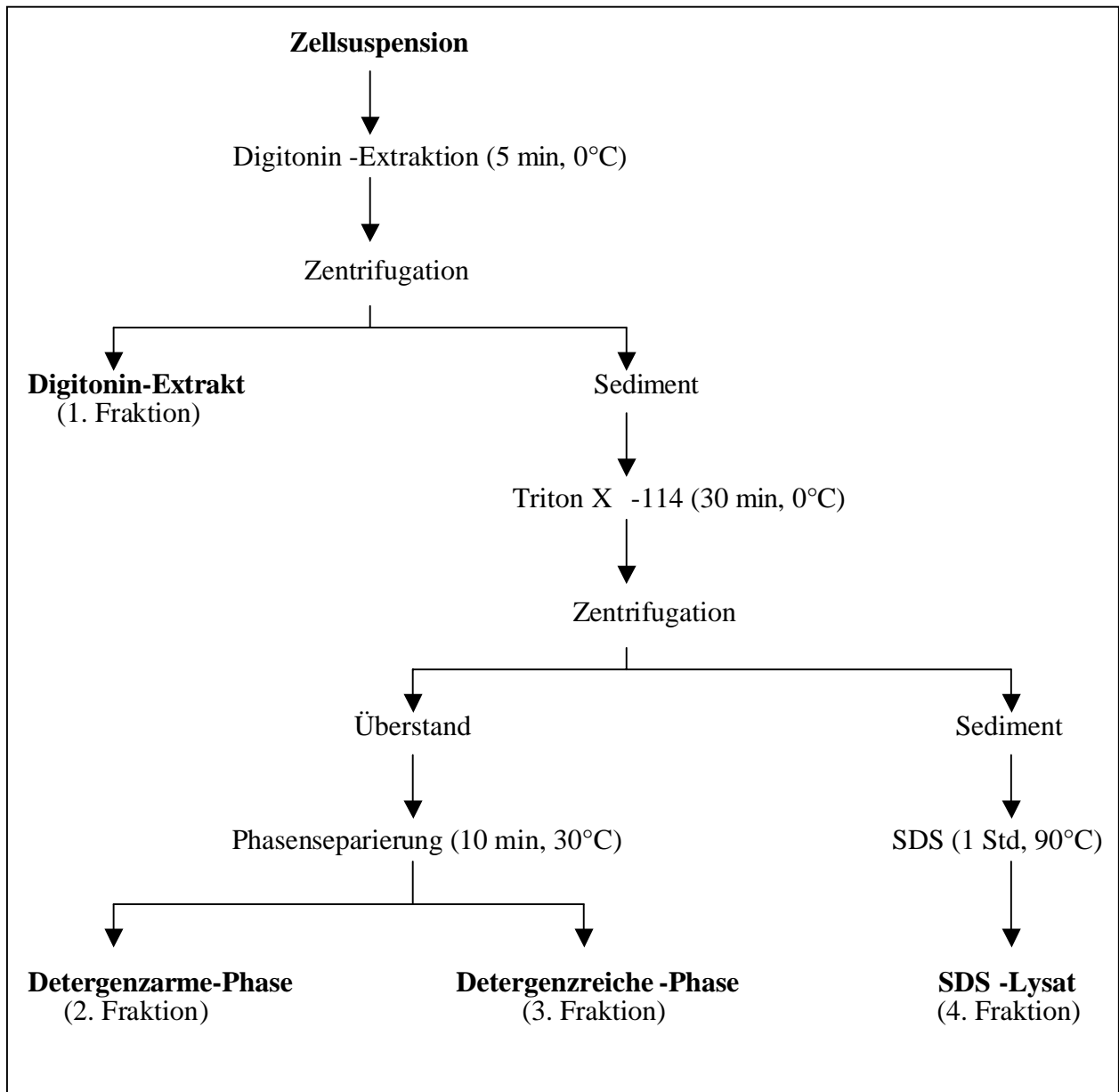


Abbildung. 4.1: Differentielle Fraktionierung mit Detergenzien.

Die Behandlung der Zellen mit Digitonin resultiert in einer Permeabilisierung der Membran und der Freisetzung von löslichen cytosolischen Komponenten. Die verbleibenden Zellhüllen werden mit Triton X-114 behandelt. Triton X-114 Lösungen sind bei 4°C homogen und separieren bei Temperaturen von ca. 30°C in eine detergenzreiche und eine detergenzarme



(wäßrige-) Phase, die durch Zentrifugation leicht voneinander getrennt werden können. Nach Bordier enthält die Triton-X-114-reiche Phase die integralen Membranproteine, während sich die löslichen Proteine in der wäßrigen Phase befinden.

Das Triton unlösliche Material wird mit SDS behandelt um verbleibende Proteine zu lösen.

Die nach 4.1.1 oder 4.1.7 präparierten Zellen wurden in Earle's-Puffer resuspendiert, in ein vorgewogenes 2-ml-Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei 4°C und 500 g sedimentiert (Eppendorf Tischzentrifuge) und das Feuchtgewicht bestimmt.

Das Sediment wurde mit der dem halben Volumen seines Feuchtgewichtes entsprechenden Menge Digitonin-Extraktionspuffer vorsichtig vermischt und unter leichtem Schwenken 5 min in Eis inkubiert. Anschließend wurde wie zuvor sedimentiert, das Digitonin-Extrakt abgezogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C gelagert. Das verbleibende Sediment wurde in vorgekühltem Triton-X-114-Lysepuffer resuspendiert, 30 min unter Schwenken in Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 20000x g und 4°C zentrifugiert (Heraeus Tischzentrifuge). Der Überstand wurde abgenommen und 10 min bei 30°C inkubiert. Es haben sich nun zwei Phasen gebildet, die durch Zentrifugation für 3 min bei 500x g in eine obere, wäßrige- und eine untere Detergenzphase separiert werden konnten.

Die wäßrige Phase wurde abgezogen, in einem neuen 2-ml-Reaktionsgefäß mit einem Volumenanteil Triton-X-114-Lysepuffer versetzt und 5 min in Eis inkubiert. Die klare Lösung wurde 10 min bei 30 °C inkubiert und zur Phasentrennung wie zuvor zentrifugiert. Die Detergenzphase wurde mit einem Volumenanteil Puffer A versetzt und die Extraktion der löslichen Proteine in analoger Weise durchgeführt. Der Vorgang wurde jeweils noch einmal wiederholt.

Das in Triton-X-114 unlösliche Sediment wurde mit 1 ml PBS gewaschen und für 1 h mit 1 ml 5 % (w/v) SDS-Lösung bei 90°C inkubiert. Die hohe Viskosität des Lysates konnte durch anschließende Zugabe von 5 µl Benzonase ( $\geq 25$  U/µl) und Inkubation für 30 min bei 37°C beseitigt werden.

Die fraktionierten Proteine wurden mit Aceton gefällt (4.2.2), in Aufschlusspuffer gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C gelagert.

*Herstellung von Digitonin-Extraktionspuffer*

<u>Digitonin-Extraktionspuffer:</u>	10 mM	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
	0,015 % (w/v)	Digitonin
	300 mM	Saccharose
	100 mM	NaCl
	3 mM	MgCl <sub>2</sub>
	5 mM	EDTA
	1 mM	PMSF

<u>PIPES-Puffer:</u>	1,2 M	Saccharose
	0,4 M	NaCl
	40 mM	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
	12 mM	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O

Der Puffer wurde durch einen 0,45- $\mu$ m-Filter filtriert und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

18,75 mg Digitonin wurden in 10 ml PIPES-Puffer unter Erwärmen gelöst und 1 ml PMSF (100 mM in Isopropanol) langsam unter Rühren zugegeben. Die Lösung wurde mit 15 ml PIPES-Puffer und 5 ml EDTA (100 mM) vermischt und pH 6,8 bei 4°C mit HCl eingestellt. Das Volumen wurde mit H<sub>2</sub>O auf 100 ml ergänzt und die fertige Lösung bei - 80°C gelagert.

*Herstellung von Triton X-114 Lysepuffer*

Triton X-114-Lysepuffer : 5 % (w/v) Triton X-114 in Puffer A

Puffer A:  
20 mM Tris/HCl, pH 7,5  
100 mM NaCl  
2 mM EDTA

Kommerziell erhältliches Triton X-114 besteht aus einem Gemisch von p-tert-Octylphenyl-polyoxyethylen, in dem die Länge der Polyoxyethylenketten um einen Mittelwert schwankt. Da die Länge der Ketten einen Einfluss auf die Temperatur hat, bei der die Phasentrennung stattfindet, ist es notwendig, eine Vorkondensierung durchzuführen, um eine homogene Triton-Präparation zu erhalten (Wissing et al., 2000).

20 g Triton X-114 wurden bis zu einem Volumen von 400 ml mit Puffer A vermischt und bei 0°C im Eis-/Wasserbad inkubiert. Die dabei entstandene klare Lösung wurde zur Phasentrennung über Nacht bei 30°C inkubiert und die obere, wäßrige Phase entfernt und durch Puffer A ersetzt. Der Vorgang wurde noch zweimal wiederholt und anschließend das Ausgangsvolumen von 400 ml mit Puffer A hergestellt.

#### 4.2.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D Gelelektrophorese) ermöglicht die Trennung komplexer Proteingemische in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Die Separation in der ersten Dimension erfolgt durch isoelektrische Fokussierung aufgrund der Ladung der Proteine. Als zweite Dimension schließt sich senkrecht dazu eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese an, bei der die Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden.

##### 4.2.4.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

<u>Basispuffer:</u>	7 M	Harnstoff
	2 M	Thioharnstoff
	91 mM	DTT
	2,5 % (v/v)	IPG-Puffer
	4 % (w/v)	Chaps
		Bromphenolblau

<u>Rehydratisierungspuffer:</u>	7 M	Harnstoff
	2 M	Thioharnstoff
	18 mM	DTT
	0,5 % (v/v)	IPG-Puffer
	4 % (w/v)	Chaps
		Bromphenolblau

Für die isoelektrische Fokussierung wurden Gelstreifen mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG) verwendet. Die Gradienten hatten einen pH-Bereich von 4–7 und eine Länge von 24 cm. Die Rehydratisierung der IPG-Streifen und das Auftragen der Probe erfolgte in einer dafür vorgesehenen Rehydratisierungskassette. Die Proben wurden auf 360  $\mu\text{l}$  mit Aufschlusspuffer aufgefüllt, mit 90  $\mu\text{l}$  Basispuffer vermischt und jeweils in die Mitte einer Quellkammer pipettiert. Die Gelstreifen mußten anschließend so aufgelegt werden, daß sich ein luftblasenfreier Flüssigkeitsfilm unter dem Gel ausbilden konnte. Die Streifen wurden mit Paraffinöl überschichtet und 14 h in der Kassette inkubiert.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte bei konstant 20°C mit einer Stromstärke von maximal 50  $\mu\text{A}$  pro Streifen nach dem in Tabelle 4.1 angegebenen Programm mit dem IPGphor System der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Unter die Elektroden wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  angefeuchtete Filterpapiere gelegt und die Gele mit Paraffinöl überschichtet.

Tabelle 4.1: Programm für die isoelektrische Fokussierung.

Stufe	Spannung [V]	Volt-Stunden [Vh]	Spannungsverlauf
1	200	200	Stufe
2	500	500	Stufe
3	1000	1000	Stufe
4	8000	4000	linearer Gradient
5	8000	72000	-

#### 4.2.4.2 Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

<u>Reduzierungspuffer:</u>	6 M	Harnstoff
	50 mM	Tris/HCl, pH 8,8
	30 % (v/v)	Glycerin
	4 % (w/v)	SDS
	65 mM	DTT
<u>Alkylierungspuffer:</u>	6 M	Harnstoff
	50 mM	Tris/HCl, pH 8,8
	30 % (w/v)	Glycerin
	4 % (w/v)	SDS
	260 mM	Iodacetamid
		Bromphenolblau
<u>Elektrophorese-Puffer:</u>	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
<u>Zusammensetzung der Gelmatrix:</u>	12,8 % (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid
	375 mM	Tris/HCl, pH 8,8
	0,1 % (w/v)	SDS
	0,05 % (w/v)	APS
	0,03 % (v/v)	TEMED

Um einen optimalen Proteintransfer von der ersten in die Zweite Dimension zu gewährleisten, mußten die IPG-Gelstreifen in einem zweistufigen Äquilibrierungsschritt mit einem SDS-haltigen Puffer gesättigt werden. Die Lösung des ersten Äquilibrierungsschrittes enthält DTT zur Reduzierung von Disulfidbindungen. Eine Reoxidation der Thiolgruppen wird im zweiten Schritt durch die Behandlung mit Iodacetamid verhindert.

Die Gelstreifen wurden in verschließbare Kunststoffröhrchen überführt und für jeweils 10 min in 15 ml Reduzierungspuffer und anschließend in 15 ml Alkylierungspuffer geschwenkt.

Für die Trennung in der zweiten Dimension wurde das Ettan DALT II System der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet, mit dem bis zu 12 Gelelektrophoresen parallel

durchgeführt werden konnten. Mit der zu dem System gehörenden Gießkammer konnten 14 Polyacrylamidgele der Größe 25,5 x 20,5 x 0,01 cm<sup>3</sup> gleichzeitig gegossen werden.

Nach dem Gießvorgang wurden die Gele mit puffergesättigtem Butanol überschichtet und für 3 – 6 h bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Anschließend wurde das Butanol durch 375 mM Tris/HCl (pH 8,8) ersetzt, die Gele in Plastikfolie eingepackt und über Nacht bei 4°C feucht gelagert.

Die IPG-Gelstreifen wurden vor dem Auflegen auf die SDS-Gele mit etwas Elektrophoresepuffer abgespült und der Tris-Puffer von der Geloberfläche abgegossen. Zum Fixieren der Gelstreifen wurde erhitzte Agaroselösung [0,5 % (w/v) in Elektrophoresepuffer] verwendet.

Die Elektrophorese wurde zunächst für 50 min mit einer Leistung von 5 W pro Gel durchgeführt, danach für ca. 3 h mit 180 W, unabhängig von der Anzahl der Gele. Die Temperatur des Elektrophorese-Puffers konnte mit Hilfe eines integrierten Kühlsystems auf konstant 15°C gehalten werden. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte.

#### 4.2.5 Visualisierung von Proteinen im Polyacrylamidgel

<u>Fixierlösung:</u>	40 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
<u>Waschlösung:</u>	10 % (v/v)	Methanol
	6 % (v/v)	Essigsäure

Für die Färbung von Proteinen in 2-D Gelen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Sypro-Ruby<sup>TM</sup> verwendet. Die Färbung mit Sypro-Ruby<sup>TM</sup> ist ähnlich empfindlich wie die Silberfärbung, erreicht jedoch einen wesentlich größeren dynamischen Bereich. Außerdem ist der Farbstoff, im Gegensatz zu Silber, kompatibel mit der späteren MALDI-Analyse.

Die Gele wurden mindestens 30 min in 300 ml Fixierlösung inkubiert, anschließend mit 200 ml Sypro-Ruby<sup>TM</sup> über Nacht gefärbt und noch 60 min gewaschen. Für die Färbung wurden lichtdicht verschlossene Schalen verwendet.

Die Visualisierung der Gele erfolgte mit Hilfe eines Laser-Scanners (Anregungswellenlänge 473 nm/Emissionswällenlänge >580 nm) oder auf einem Blaulicht-Transilluminator.



Zum Konzentrieren und Reinigen von Hydrolyseprodukten (4.2.7) wurden mit C<sub>18</sub>-Material gefüllte 10 µl ZipTip-Pipettenspitzen verwendet. Das Prinzip der Reinigung entspricht dem einer Reversed-Phase-Chromatographie. Um das Volumen des Eluates zu minimieren, wurden die Enden der Pipettenspitzen abgeschnitten und so das Bettvolumen auf etwa 0,3 µl halbiert.

Das für die Probenvorbereitung verwendete Wasser hatte HPLC-Qualität. Alle Lösungen wurden vor ihrer Verwendung jeweils frisch angesetzt.

Die ZipTip-Spitzen wurden durch Aufziehen von zweimal 10 µl 50 % (v/v) Acetonitril und anschließend zweimal 10 µl 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure äquilibriert und durch zehnmaliges Aufziehen von 10 µl der Peptidlösung beladen.

Die Elution der Peptide erfolgte mit 0,5 µl Elutionslösung direkt auf den Probensteller des Massenspektrometers. Die Probe wurde durch mehrmaliges Abgeben und Einsaugen mit dem gleichen Volumen an Matrixlösung auf dem Target vermischt und vor der Messung mindestens 10 min bei Raumtemperatur getrocknet.

#### 4.2.7.2 MALDI-Analyse

MALDI-MS Analysen wurden auf einem Voyager-DE-Pro Flugzeitmassenspektrometer der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Das Gerät ist mit einem UV-Stickstofflaser ( $\lambda = 337$  nm), sowie einer Ionenquelle mit verzögerter Extraktionstechnologie (*delayed extraction*) ausgestattet.

Für die Kalibrierung des Massenspektrometers wurde der Peptidstandard-Kit Sequazyme der Firma Perseptive Biosystems verwendet (Tabelle. 4.2). Die Peptidmischungen wurden nach den Angaben des Hersteller angesetzt. Für die Kalibrierung im Massenbereich 700 – 3500 Da wurde 1 µl einer 1 zu 1 Mischung der Mixturen 1 und 2 mit 24 µl Matrixlösung vermischt und davon 1 µl auf den Probenstelleraufgetragen.

Die Analysen erfolgten im Reflektormodus mit eingeschalteter verzögerter Ionenextraktion. Für die Auswertung der Spektren wurde das Programmpaket Analyst (Applied Biosystems) herangezogen.



Tabelle 4.2: Peptidstandards zur Kalibrierung des Massenspektrometers.

<sup>1.)</sup> in der Peptidmischung 1 enthalten, <sup>2.)</sup> in der Peptidmischung 2 enthalten

Peptid	[M+H] <sup>+</sup> mittleres m/z	[M+H] <sup>+</sup> monoisotopisches m/z	Konzentration pmol/μl
Des-Arg <sup>1</sup> -Bradykinin <sup>1.)</sup>	905,05	904,4681	0,5
Angiotensin I <sup>1.)</sup>	1297,51	1296,6853	1,65
Glu <sup>1</sup> -Fibrinopeptide B <sup>1.)</sup>	1571,61	1570,6774	0,65
ACTH (1- 17) <sup>2.)</sup>	2094,46	2093,0867	1
ACTH (18 –39) <sup>2.)</sup>	2466,72	2465,1989	0,75

### 4.3 Nukleinsäureanalytik

#### 4.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Sequenzen *in vitro* genutzt (Mullis, 1987).

Für die Reaktion wurden folgende Komponenten in einem 200- $\mu$ l-Reaktionsgefäß vermischt und das Standardprogramm (Tabelle. 4.3) durchgeführt:

2,5	$\mu$ l	10x PCR-Puffer
0,5	$\mu$ l	10 mM dNTP-Mix
0,75	$\mu$ l	50 mM MgCl <sub>2</sub>
1	$\mu$ l	10 pmol/ $\mu$ l Plusstrang-Primer
1	$\mu$ l	10 pmol/ $\mu$ l Minusstrang-Primer
5	$\mu$ l	DNA-Vorlage
0,25	$\mu$ l	Taq DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)
ad 25	$\mu$ l	HPLC-H <sub>2</sub> O

Bei der Verwendung von cDNA wurde die angegebene Menge Vorlage eingesetzt. Bei der Verwendung von Plasmiden wurden 0,4 ng DNA als Vorlage eingesetzt. In diesem Fall wurden die übrigen Komponenten in doppelter Menge zugegeben und der Ansatz auf 50  $\mu$ l mit HPLC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Tabelle. 4.3: Standardprogramm der Polymerase-Kettenreaktion.

Vorgang	Dauer [min ]	Temperatur[°C]
Start:	1,5	94
Zyklen:		
Denaturierung	0,5	94
Annealing	0,5	T <sub>A</sub>
Synthese	1	72
Termination:	7	72

Während der Pipettiervorgänge standen alle Lösungen und die Reaktionsgefäße in Eis. Nach Zugabe der Taq-Polymerase wurden die Ansätze direkt in das PCR-Gerät überführt und das Programm gestartet. Bei der Durchführung der Reaktion mit den Primerpaaren

alphaKAP.s1/alphaKAP.as1 und hsCaMK.Ns1/hsCaMK.Nas1 wurde Platinum-Taq-Polymerase verwendet, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen. Nach dem Syntheseabschluss wurden alle Ansätze auf 8°C abgekühlt. Die Anzahl der jeweils durchgeführten Zyklen und die Annealing-Temperaturen ( $T_A$ ) der eingesetzten Primer sind in Tabelle 4.4 angegeben .

Tabelle 4.4: Empirisch ermittelte Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer und Anzahl der durchgeführten Zyklen der Polymerase-Kettenreaktion.

Primer	Annealing-Temperatur	Zyklen
cytb5.s/cytb5.as	60°C	35
alphaKAP.s1/ alphaKAP.as1	52°C	40
CamK2A.s3/ alphaKAP.as1	62°C	30
hsCamK.Ns1/hsCamK.Nas1	58°C	35

#### 4.3.1.1 PCR zur Durchmusterung von Bakterienkolonien

Zur Überprüfung von Bakterien-Kolonien auf eine Plasmid-Insertion, konnte die PCR nach einer Transformation direkt von den Bakterien-Kolonien mit Plasmid- bzw. Insert-spezifischen Primern durchgeführt werden (Dallas-Yang et al., 1998). Hierzu wurde eine Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher in 15 µl H<sub>2</sub>O überführt und fünf Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde eine Mischung folgender Komponenten zugegeben und das Standardprogramm (Tabelle 4.3) mit 30 Zyklen durchgeführt.

- 2 µl 10x PCR-Puffer
- 0,4 µl 10 mM dNTP-Mix
- 1 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,5 µl 10 pmol/µl Plusstrang-Primer
- 0,5 µl 10 pmol/µl Minusstrang-Primer
- 0,2 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)
- 2,4 µl HPLC-H<sub>2</sub>O

Die für den Vektor pGEM-T Easy spezifischen Primer M13 und M13rev wurden bei einer Annealing-Temperatur von 50 °C eingesetzt. Für Insert-spezifische Primer gelten die in Tabelle 4.4 angegebenen Temperaturen.

#### 4.3.2 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

<u>TAE-Puffer:</u>	0,04 M	Tris
	0,02 M	Essigsäure
	2 mM	EDTA
<u>Auftragspuffer:</u>	50 % (v/v)	Glycerin
	0,2 % /w/v)	SDS
	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,05 % (w/v)	Xylencyanol
		In TAE-Puffer

Nukleinsäuren lassen sich in nichtdenaturierenden, horizontalen Agarosegelen elektrophoretisch trennen und sichtbar machen. Die Auswahl der Agarosekonzentration richtet sich nach der Länge der zu trennenden DNA-Fragmente: > 1 kb, 1 % (w/v); 0,5 - 1 kb, 1,5 % (w/v); 0,2 - 0,5 kb, 2 % (w/v). Eine bessere Auftrennung kleinerer Fragmente kann man in Polyacrylamidgelen erreichen (4.3.3)

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 50 ml TAE-Puffer für Gele der Dimension 7,0 x 8,0 cm<sup>2</sup>, bzw. in 90 ml für Gele der Dimension 10,0 x 14,5 cm<sup>2</sup> aufgeschlämmt und im Mikrowellengerät bis zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml in TAE-Puffer) pro 10 ml Agarose-Lösung zugesetzt und das Gel in die entsprechende Apparatur mit Taschenformer gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde der Taschenformer entfernt und das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Die aufzutragende DNA-Probe wurde mit dem 0,2fachen ihres Volumens an Auftragspuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei konstant 120 V ca. 30 min durchgeführt. Die Visualisierung der DNA erfolgte im UV-Licht bei 312 nm.

### 4.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

<u>Polymerisationslösung:</u>	5 ml	Rotiphorese 40 (40 % T, 5 % C)
	4 ml	5x TBE-Puffer
	30,8 ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
	128 µl	APS [25 % (w/v)]
	36 µl	TEMED
<u>5x TBE-Puffer:</u>	500 mM	Tris
	415 mM	Borsäure
	5 mM	EDTA
<u>Auftragspuffer:</u>	30 % (v/v)	Glycerin
	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,25 % (w/v)	Xylencyanol
	in TAE-Puffer	

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von weniger als 200 bp erfolgte in 5 %igen (w/v) Polyacrylamidgelen der Dimension 20,0 x 20,0 x 0,1 cm<sup>3</sup>.

Die Glasplatten wurden gründlich mit Spülmittel und 2-Propanol gereinigt und mit 1 mm Abstandhaltern und einem Taschenformer zusammengesetzt. Die Seitenränder wurden mit 1 % (w/v) Agarose-Lösung abgedichtet und die Polymerisationslösung zwischen die Platten gegossen. Nach ca. 1 h war das Gel auspolymerisiert und konnte verwendet werden.

Die aufzutragende DNA-Probe wurde mit dem 0,2fachen ihres Volumens an Auftragspuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei konstant 300 V durchgeführt bis die Lauffront ca. 5 cm vom unteren Gelrand entfernt war.

Zum Färben der DNA wurde das Gel auf der Glasplatte belassen und 15 min in Ethidiumbromid (2 µg/ml) und anschließend zur Reduktion der Hintergrundfärbung 10 min in H<sub>2</sub>O geschwenkt. Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte im UV-Licht bei 312 nm.

#### **4.3.4 Präparation von RNA**

Für die Isolierung von RNA aus verschiedenen Geweben des Schweins wurde das Trizol-Reagenz der Firma Life Technologies nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Präparation basierte auf der von Chomczynski und Sacchi (1987) beschriebenen Methode. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete RNA wurden von der Firma Esplora zur Verfügung gestellt.

#### **4.3.5 Herstellung von cDNA**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete cDNA wurde von der Firma Esplora zur Verfügung gestellt. Die Synthese wurde von Gruhn (2002) ausführlich beschrieben.

#### **4.3.6 Herstellung transformationskompetenter *E.coli* Zellen**

Die in dieser Arbeit verwendeten transformationskompetenten *E.coli* Zellen wurden von der Firma Esplora zur Verfügung gestellt. Die Präparation der Zellen ist in Sambrook et al. (1989) beschrieben.

#### **4.3.7 Reinigung von Nukleinsäuren**

PCR-Produkte, die zur Klonierung vorgesehen waren, wurden mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen gereinigt. Es wurden jeweils 25 µl PCR-Produkt eingesetzt. Bei der Durchführung wurden die Herstellerangaben ohne Modifikationen befolgt.

#### 4.3.8 Klonierung von DNA

<u>LB-Amp-Agar:</u>	1	% (w/v)	Casein
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	0,5	% (w/v)	NaCl
	0,005	% (w/v)	Ampicillin
	1,5	% (w/v)	Agar
	pH 7,0 mit NaOH eingestellt		

<u>SOC-Medium:</u>	2	% (w/v)	Casein
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	10	mM	NaCl
	2,5	mM	KCl
	5	mM	MgCl <sub>2</sub>
	5	mM	MgSO <sub>4</sub>

IPTG: 100 mM in H<sub>2</sub>O

X-Gal: 100 mM in N,N-Dimethylformamid

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das *pGEM-T Easy Vector System* der Firma Promega eingesetzt. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung des mitgelieferten Reagenziensatzes. Die Menge des eingesetzten PCR-Produktes (4.3.1) betrug jeweils 3 µl. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

Die elektrokompetenten *E.coli* Zellen wurden kurz vor der Transformation in Eis aufgetaut, mit 2 µl des Ligationsansatzes versetzt und 1 min in Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte 0,2-cm-Elektroporationsküvette überführt und nach dem Elektropuls sofort in 300 µl SOC-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in 1,5-ml-Reaktionsgefäße zurücküberführt und 20 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden jeweils 100 µl sowie der verbleibende Rest der transformierten Zellen auf LB-Amp-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Blau-Weiß-Selektion war die Oberfläche der LB-Amp-Platten zuvor mit jeweils 40 µl IPTG und X-Gal imprägniert und anschließend getrocknet worden.

Die gesuchten rekombinanten Kolonien waren an der hellen Farbe zu erkennen, während *E.coli*-Transformanten mit nicht rekombinanten Plasmiden zu blauen Kolonien heranwuchsen.

#### 4.3.9 Plasmidisolierung

<u>LB-Amp-Medium:</u>	1	% (w/v)	Casein
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	0,5	% (w/v)	NaCl
	0,01	% (w/v)	Ampicillin
	pH 7,0 mit NaOH eingestellt		

3 ml LB-Amp-Medium wurden mit einer Einzelkolonie des plasmidtragenden *E.coli* Stammes angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1,5- ml-Reaktionsgefäße überführt und in der Tischzentrifuge sedimentiert.

Für die Isolierung der Plasmide wurde das *E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I* der Firma Peqlab verwendet. Dabei wurden die Angaben des Herstellers ohne Modifikationen befolgt.

#### 4.3.10 Extinktionsmessung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer 10-mm-Quarzküvette durchgeführt. Eine  $E_{260}$ -Einheit entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml. Als Maß für Proteinkontaminationen wurde der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  gebildet. Er sollte bei einer ausreichend proteinfreien Präparation einen Wert von 1,8 – 2,0 haben.

#### 4.3.11 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Bei der DNA-Sequenzierung kam das von Sanger et al. (1977) beschriebene Kettenterminations-Verfahren zu Anwendung.



In einem Reaktionsansatz befanden sich der in ein Plasmid integrierte, zu sequenzierende DNA-Doppelstrang, ein Primer, Taq-DNA-Polymerase, Desoxynukleotide und farbstoffmarkierte Didesoxynukleotide sowie Tris/HCl und MgCl<sub>2</sub>.

Nach thermischer Denaturierung erfolgte das Annealing des Primers und die Extension. Bei der Extension wurden sowohl unmarkierte Desoxynukleotide als auch markierte Didesoxynukleotide eingebaut, wobei letztere zum Abbruch der Extension führten. Die Zyklen des Sequenzier-Programms wurden 25 mal wiederholt.

Da die vier Didesoxynukleotide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren, konnte die Reaktion in einem Ansatz stattfinden (Smith et al., 1986).

Für die Sequenzierreaktion wurde der *ABI BigDye Terminator Sequencing Kit 2.0* der Firma Applied Biosystems verwendet. In einem 200- $\mu$ l-Reaktionsgefäß wurden 4  $\mu$ l des Sequenzier-Mixes mit 3  $\mu$ l des jeweiligen Primers (1 pmol/ $\mu$ l) und 500 ng Plasmid-DNA vermischt und das Volumen mit HPLC-H<sub>2</sub>O auf 20  $\mu$ l aufgefüllt.

<u>Sequenzier-Programm:</u>	Denaturierung	96°C	10 sec
	Annealing	T <sub>A</sub>	5 sec
	Extension	60°C	4 min

Die Annealing-Temperaturen betragen 50°C für den plasmidspezifischen Primer M13, bzw. 58°C für die insertspezifischen Primer hsCamK.Ns1 und hsCamK.Nas1.

Die Produkte der Sequenzierreaktionen wurden mit dem *Wizard MagneSil Sequencing Reaction Clean-Up System* der Firma Promega unter Befolgung der Herstellerangaben von überschüssigen Reaktionskomponenten gereinigt und mittels Kapillarelektrophorese analysiert.

Bei der Kapillarelektrophorese werden die markierten Produkte über einen Autosampler in eine mit Polymer gefüllte Kapillare injiziert. Die markierte DNA wird in der Kapillare elektrophoretisch nach der Länge aufgetrennt. Dabei passiert sie einen Detektionsbereich, wo die Fluoreszenzfarbstoffe, durch einen Argonlaser angeregt, Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren. Das spektrographisch separierte Licht wird mit einer CCD-Kamera aufgenommen als elektrisches Signal gespeichert. Diese Daten werden mit der Analyse-Software zu vierfarbigen Elektropherogrammen verrechnet. Die Elektropherogramme repräsentieren die Basen der DNA durch Peaks in unterschiedlichen Farben.

#### 4.3.12 Herstellung radioaktiv markierter Nukleinsäuren

Die radioaktive Markierung von PCR-Produkten mit  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP erfolgte nach einer Methode von Feinberg und Vogelstein (1983). Dabei wurde das *Rediprime II DNA Labeling System* der Firma Amersham Pharmacia Biotech gemäß den Angaben des Hersteller verwendet. Nichtinkorporierte Nukleotide wurden durch eine Gelpermeationschromatographie mit *ProbeQuant G-50 Micro Columns* nach Herstellerangaben abgetrennt.

#### 4.3.13 Transfer von RNA auf Nylonmembranen

RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Kapillartransfer auf Nylon-Membranen übertragen. Die Durchführung einer denaturierenden Gelelektrophorese von RNA, sowie der Aufbau eines Kapillarblots sind ausführlich in Sambrook et al. (1989) beschrieben.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Blots wurden von der Firma Esplora zur Verfügung gestellt.

#### 4.3.14 RNA/DNA-Hybridisierung

20x SSC:                      3 M    NaCl  
   0,3 M    Natriumcitrat  
   pH 7 mit HCl eingestellt

Die Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden wurde in Glasröhrchen der Maße 14,5 cm x 3,7 cm unter Rotation in einem temperierbaren Hybridisierschrank durchgeführt. Die Nylonmembran wurde aufgetaut, kurz in 2x SSC inkubiert und luftblasenfrei in die Röhrchen überführt. Die Absättigung freier Bindestellen für DNA erfolgte durch Inkubation der Membran mit 5 ml *ExpressHyb* der Firma Clontech für 1 h bei 68°C. Anschließend wurde die Lösung gegen 5 ml frische *ExpressHyb*-Lösung ausgetauscht, die das Sondenmaterial (4.3.12) enthielt und über Nacht bei 68°C inkubiert. Die *ExpressHyb*-Lösungen wurden vor der Verwendung auf 68°C vorgewärmt.

Zum Entfernen unspezifisch gebundener Sondenmoleküle wurde die Membran viermal bei Raumtemperatur für je 10 min mit 2x SSC / 0,05 % (w/v) SDS und zweimal bei 50°C für je 20 min mit 0,1x SSC / 0,1 % (w/v) SDS gewaschen.

Die Membran wurde anschließend in Haushaltsfolie eingeschlagen und mit einem aufgelegten Röntgenfilm in einer Exponierbox mit Verstärkerfolie bei - 80°C inkubiert. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte nach den Herstellerangaben.