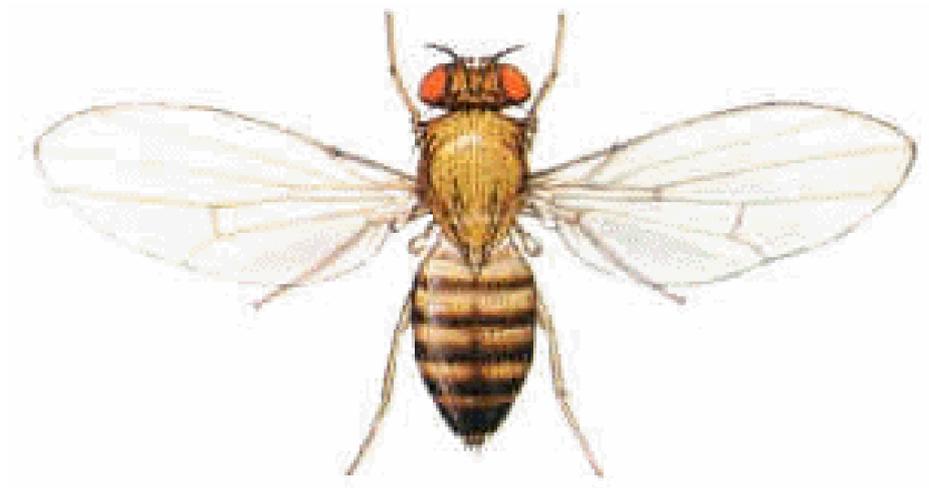


# Entwicklungs- und Zellbiologie

Wahlpflichtpraktikum

WS 2012/2013



Institut für Zoologie

Lehrstuhl für Zoologie und Entwicklungsbiologie

---

Prof. H.O. Gutzeit

Dr. S. Richter

Y. Henker

## Zeitplan

Tag	Vormittags 9:20 Uhr	Nachmittags 13:00 Uhr	Seminare	Anmerkung
19.11.	10 Drosophila WT Tubes vorbereiten für 11.12. (8 Gruppen )			
28.11		für V1	Medaka Eier absammeln (200)	
29.12.		für V1 und für V4	Medaka Eier absammeln (200) Medaka Eier absammeln (> 50)	
30.12.		für V1	Medaka Eier absammeln (200)	
Mo 03.12.	<b>1</b> Zellkultur Medaka Embryonen	<b>1</b> Fortsetzung  <b>2</b> HepG2/ Kultur ansetzen für V2 und V3	<b>9.20 Uhr (Richter, E34):</b>  • Belehrung • zu V1 (Retinsäure)	Für V4 >100 Eier (am 07.12. 4d alte Embryonen); <i>Und NEU</i> <b>Für V5a 150 EIER</b>
Di 04.12.		<b>2</b> HepG2/Transfektion <b>1</b> Dokumentation, komplett Medienwechsel	<b>15 Uhr (Gutzeit):</b>  • zu Transfektion und Hitzeschock (V2) und Drosophila (V6)	Sem. in der 2h-igen Pause!!
Mi 05.12. 11.10 Uhr	<b>2</b> hsp70-GFP- Induktion <i>(Beobachtung nach der Mittagspause)</i>	<b>2</b> Fortsetzung <b>1</b> Dokumentation, Medienwechsel		
Do 06.12.		<b>3</b> Apoptose HepG2 <b>1</b> Beobachtung/Foto		
Fr 07.12.	<b>4</b> Genexpression Schlupfenzym: RNA-Isolierung	<b>4/1</b> cDNA-Synthese  <b>1</b> Dokumentation, Medienwechsel  <b>5a</b> Terasaki-Platte (evtl. erst am Montag)	<b>9.20 Uhr (Richter):</b>  • zu V4	für V5 12.12.: 100 Eier <i>und</i> für V4: 200 Eier (Blastulastadium)

Mo 10.12.	<b>4</b> PCR  <b>5a</b> Embryonen auf Terasaki-Platte überführen	<b>4</b> PCR  <b>5a</b> Embryonen auf Terasaki-Platte überführen	<b>Während Gelelekt.</b> <b>(Richter):</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• zu V5 und V7</li></ul>	Für V5 13.12.: 100 Eier <i>Und</i> für V6: 10 Tuben Drosoph. auf Hefe
Di 11.12.		<b>6</b> Drosophila / Mikroskopie  <b>5a</b> Terasaki-Platte (Schlupfenzym-Lösung entnehmen)	<b>13 Uhr :</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• zu Fluoreszenz-mikroskopie Drosophila-Follikel</li></ul>	>120 befruchtete Eier (1-2 h alt) in Stickstoff und am Abend Medaka-Pärchen trennen
Mi 12.12. 11.10 Uhr	<b>7</b> Medaka-Eihülle	<b>5b</b> Präparation des Schlupfenzym  <i>Mittagspause</i> <b>7</b> Medaka-Eihülle (Gelelektrophorese)		Für V7 12.12.: 10 Weibchen für Präp. unbefr. Eier
Do 13.12.		<b>5</b> Test Schlupfenzym <b>7</b> Gele einscannen, Auswertung	<b>13 Uhr:</b> Fischhälterung	
Fr 14.12.	<b>1</b> Zellidentifizierg. und Gelelektrophorese	<b>Abschlußbesprechung zu den Versuchen (jede Gruppe ein Versuch)</b>		

Graue Felder: Anmerkungen für Kursassistenten zur Vorbereitung

**Seminare** werden bei Bedarf zu Beginn des Kurses durchgeführt. Verwenden Sie bitte auch die einschlägigen Lehrbücher der Zoologie, Zell- und Entwicklungsbiologie für die Vor- und Nachbereitung des Kurses.

**Protokolle** sollten im Kurs angefertigt und spätestens in der ersten Januar-Woche abgegeben werden! Nutzen Sie längere Inkubationspausen zur Anfertigung der Protokolle.

**Bitte an allen Tagen Präparierbesteck und Kittel mitbringen!**

**Inhaltsverzeichnis**

1	Etablierung einer Zellkultur aus Embryonen des Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> ) .....	3
1.1	Versuchsprinzip und Präparation .....	4
1.2	Benötigte Organismen .....	4
1.3	Versuchsdurchführung.....	5
2	Stressnachweis durch Transfektion.....	9
2.1	Versuchsdurchführung.....	11
2.2	Auswertung.....	15
2.3	Anhang.....	16
2.4	Lösungen/Materialien .....	17
3	Quantifizierung von Apoptose.....	18
3.1	Sressinduktion der HepG2 Zellen.....	18
3.2	Auswertung.....	18
3.3	Lösungen/Materialien .....	19
4	Genexpression des Schlupfenzym vom Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> ).....	20
4.1	Versuchsprinzip.....	21
4.2	RNA-Isolierung.....	21
4.3	Bestimmung der RNA-Konzentration .....	23
4.4	Erststrang-cDNA-Synthese.....	24
4.5	PCR .....	26
4.6	Gelelektrophorese .....	28
4.7	Protokoll.....	30
4.8	Materialien und Geräte .....	32
4.9	Lösungen .....	33
5	Präparation des Schlupfenzym .....	36
5.1	Gewinnung mittels Terasaki-Platte (a) .....	36
5.2	Isolierung aus Embryonen-Extrakt (b) .....	37
	Vorbereitung.....	37
5.3	Inkubation mit dem Embryoextrakt.....	37
	Materialien.....	38
	Lösungen.....	38
6	Fluoreszenzmikroskopie von DNA und Mikrofilamenten an Follikeln der Taufliege <i>Drosophila melanogaster</i> .....	39

6.1	Theoretische Grundlagen: Oogenese von <i>Drosophila</i> .....	39
6.2	Experimenteller Ablauf.....	40
7	Umstrukturierung der Eihülle beim Medaka nach Befruchtung.....	45
7.1	Versuchsprinzip.....	46
7.2	Gewinnung befruchteter Eier .....	46
7.3	SDS-PAGE: Vorbereiten des Gels.....	46
7.4	Präparation der unbefruchteten Eier.....	47
7.5	Präparation des Chorions der befruchteten Eier.....	47
7.6	Präparation von Dotterproteinen.....	47
7.7	Proteinbestimmung nach Bradford .....	48
7.8	Gelelektrophorese .....	48
7.9	Zusammensetzung der Gele .....	49
7.10	Materialien .....	50
8	Hinweise zur Anfertigung der Protokolle.....	52
9	Literatur.....	53

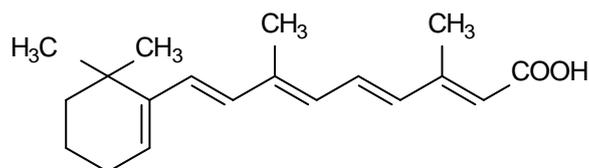
**Achtung!** Zunächst werden die Versuche 2 und 3 vorbereitet und die HepG2-Zellen für den Transfektionsversuch ausgebracht. Danach wird mit Versuch 1 begonnen.

## 1 Etablierung einer Zellkultur aus Embryonen des Medaka (*Oryzias latipes*)

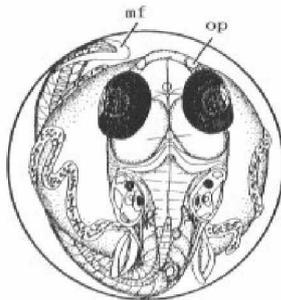
Die Herstellung und der Einsatz von Zellkulturen sind Standardverfahren in der Zellbiologie. So sind Untersuchungen von biochemischen und physiologischen Prozessen möglich, indem Zellen als Modell für den lebenden Organismus eingesetzt werden.

Embryonale Zellen besitzen zunächst eine Totipotenz, d.h. sie können sich prinzipiell zu jeder spezialisierten Zelle entwickeln. Da im Verlauf der Differenzierung die Zellen diese Totipotenz verlieren, werden für die Gewinnung von Zellkulturen häufig sich ausdifferenzierende Gewebe, z.B. embryonale Gewebe verwendet. Aus einem anderen Grund ist die Gewinnung embryonaler Zellen von großem Interesse. Sie können nach genetischer Manipulation in frühe Stadien eines Embryos zur Erzeugung sogenannter Mosaik-Embryonen eingepflanzt werden und stellen so eine Möglichkeit zur Erzeugung stabiler transgener Tiere dar. Dies gelingt aber nur mit Zellen der Blastula, die für sogenannte ES-Zellkulturen (ES = embryonale Stammzellen) eingesetzt werden können. Die Kultur von ES-Zellen ist aber relativ kompliziert und erfordert den Zusatz verschiedener Wachstumsfaktoren. **Im Praktikumsversuch wird daher keine ES-Zellkultur** sondern eine Kultur von Zellen aus späteren Embryonalstadien angelegt.

Außerdem soll der Einfluß von all-*trans*-Retinsäure auf die Differenzierung der embryonalen Zellen untersucht werden. Retinsäure ist ein sogenanntes Morphogen und spielt eine Rolle bei der Differenzierung während der Embryonalentwicklung und der Musterbildung. In ES-Zellkulturen konnte z.B. mit Retinsäure die Differenzierung bestimmter Zelltypen, z.B. neuronale Zellen induziert werden (Bain, 1995).



**Abbildung 1:** All-*trans*-Retinsäure

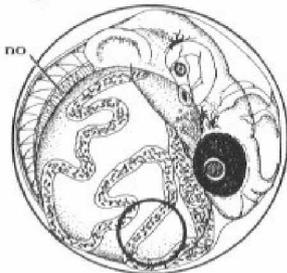


by T. Iwamatsu

(Abbr. mf: membranous fin, no: notochord, op:, olfactory pit)

Stage 33 (4 days 10 hrs) Stage at which notochord vacuolization is completed:  
The tail tip has not yet reached within interocular distance of the eye. Because the eyeball (choroidea) is very dark, the lenses can be seen only with strong transillumination. The notochord is completely vacuolized to the end of the tail. The pineal gland is distinct at the dorsal surface of the vascularized forebrain. The tips of the membranous margins of the pectoral fins reach the 4th somite.

Stage 33



**Abbildung 2:** Embryonalstadium 33 des Medakas. Abbildung entnommen aus:

<http://biol1.bio.nagoya-u.ac.jp:8000/stage-map.html>

## 1.1 Versuchsprinzip und Präparation

Präpariert werden junge Embryonen des Medakas (japanischer Reiskärpfling) im Stadium 33-35 (Stadien nach Iwamatsu, 1994; Alter ca. 5 Tage, ggf. auch 4 und 6 Tage alt). Die Embryonen werden kurz desinfiziert. Die Präparation aus dem Chorion erfolgt mittels Pinzetten. Anschließend werden die Zellen in mehreren Schritten gewonnen.

**Anmerkung:** Zum Transfer der Embryonen verwendet man entweder Pinzetten (steril) oder eine 1 ml-Pipette mit einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze (autoklaviert, mit steriler Schere abgeschnitten).

## 1.2 Benötigte Organismen

Es werden etwa 5 Tage (evtl. auch 4 und 6 Tage) alte Embryonen (40-80 Stk. Pro Gruppe) des Medaka benötigt.

### 1.3 Versuchsdurchführung

- 50 ml Komplettmedium in einem sterilen Becherglas unter der Sterilbank wie folgt herstellen: 38 ml L-15 mit 10 ml FBS, 1 ml Gentamycin-Lösung (GIBCO: 10000 IU/ml) und 1ml Glutamin-Lösung
- dieses Medium sterilfiltrieren mittels 20 ml Spritze und 0,2 µm Sterilfilter in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen
- eine Petrischale mit OL-PBS befüllen und 80 Eier hinein pipettieren (unsteril am Arbeitsplatz mit abgeschnittener Pipettenspitze) *Achtung! OL-PBS steril unter Sterilbank abfüllen!*
- ein Well einer sterilen 6er Wellplatte mit 2 ml OL-PBS befüllen (OL-PBS steril abfüllen!)
- jetzt am Arbeitsplatz weiterarbeiten
- Transfer der Eier mit einer 1000er Mikropipette und abgeschnittener blauen Pipettenspritze in das Well mit OL-PBS. Achtung! Damit die Pipettenspitze steril bleibt, sollte die Schere vorher in der Flamme eines Bunsenbrenners sterilisiert werden.
- Eier kurz spülen, den OL-PBS vorsichtig ohne Eier wieder abnehmen
- Zugabe von 1 ml 1%-iger Na-Hypochlorit-Lösung, 1min (nicht länger) inkubieren und erneut abnehmen
- spülen der Eier mit 1 ml OL-PBS, abnehmen und Zugabe von 1 ml 70% Ethanol
- 1min darin inkubieren, Ethanol entfernen und danach 3x spülen mit OL-PBS (je 1ml)
- 80 Embryonen pro Versuchsgruppe werden präpariert, indem Dotter und Chorion entfernt werden. Ggf. die Embryonen zur Präparation in eine größere sterile Petrischale überführen. Embryonen sollten immer vollständig mit OL-PBS bedeckt sein. Während der Präparation abgelöste Eihüllen entfernen. (mit Pinzetten am Arbeitsplatz – nicht unter Sterilbank, Pinzetten vorher abflammen – Kanülen zum

Öffnen des Chorions) Die präparierten Embryonen in ein neues Well mit OL-PBS überführen.

- **Ab jetzt unter der Sterilbank arbeiten!!!**
- die Embryonen in ein 15ml Zentrifugenröhrchen geben und absetzen lassen
- Noch 2mal mit 1 ml OL-PBS waschen (zwischendurch immer absetzen lassen)
- PBS vollständig entfernen
- 100 µl der EDTA-Trypsin-Stammlösung (0,2 / 0,5 %) 1:10 mit OL-PBS verdünnen (d.h. + 0,9 ml OL-PBS) und zu den Embryonen geben
- Die Embryonen werden bei Raumtemperatur 5 Minuten in der Trypsinlösung inkubiert und durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt.
- Die Zellen werden zentrifugiert in 15 ml-Zentrifugenröhrchen (3.000 rpm für 5 Minuten).
- Überstand abpipettieren. Vorsicht, das Pellet kann sich sehr leicht ablösen! Die Zellen (Pellet) werden in 2 ml L-15-Komplettmedium (siehe oben, Pkt. 1) resuspendiert (*bei Verwendung von nur 40 Embryonen in 1 ml L-15-Komplettmedium resuspendieren*)
- Die Lösung mit den Zellen wird auf 4 Wells einer 12er (oder 24er) Multiwellschale ( $\gamma$ -sterilisiert) aufgeteilt (je 500 µl) und mit Komplettmedium auf 1 ml ergänzt (je 500 µl) - (*bei Verwendung von nur 40 Embryonen in 1 ml Medium auf nur 2 Wells aufteilen*)
- In die übrigen Näpfe der Multischale wird steriles Wasser (oder steriles OL-PBS) gegeben (Zur Verhinderung der Austrocknung der gesamten Multischale!).
- Die Inkubation erfolgt bei **27 °C (feucht, Inkubator)**. Alle 2 Tage werden 500 µl des Mediums gegen frisches Medium ausgetauscht. Die Temperatur ist zu überprüfen! Wird ein Brutschrank ohne Luftbefeuchtung verwendet, müssen die Kulturschalen mit Parafilm abgedichtet werden.

*Mittagspause!!*

### 1.3.1 Einfluß von Retinsäure auf die Differenzierung der embryonalen Zellen (erst dienstags RA draufgeben!)

Probenaufteilung: 2 Wells: 0,1% DMSO als Kontrolle  
2 Wells: 0,2  $\mu$ M all-trans-Retinsäure

Jede Gruppe hat 4 Wells mit verschiedenen Substanzen.

- **Herstellung von 10 ml Komplettmedium mit 0,2  $\mu$ M all-trans-Retinsäure:** 10  $\mu$ l der DMSO-Retinsäure-Stammlösung (0,2 mM) mit 10 ml Komplettmedium mischen
- **Herstellung von 10 ml Komplettmedium mit 0,1%DMSO:** 10  $\mu$ l von konz. DMSO mit 10 ml Komplettmedium mischen
- In dem entsprechenden Well wird nach 24 h das Komplettmedium durch das jeweilige Versuchsmedium getauscht.
- Beobachten sie, ob im Vergleich zur Kontrolle im Laufe der nächsten Tage Veränderungen in der Zellmorphologie auftreten und dokumentieren sie diese anhand von Zeichnung und Mikroskopie (Aufnahmen mit Wasabi)). Eine quantitative Auswertung kann erfolgen, indem sie z.B. die Zahl der Foci von Melanin-bildenden Zellen (d.h. „Inseln“ mit Melanin-bildenden Zellen) in der Kontrolle mit der Retinsäure-behandelten Kultur vergleichen.

### 1.3.2 Geräte und Materialien

- Binokular (1 pro Gruppe)
- 6er Multischalen zum Desinfizieren und Waschen der Embryonen (1 pro Gruppe)
- 12er Multischalen für die Zellkultur (1 pro Gruppe)
- sterile kleine Glaspetrischalen für die Präparation der Embryonen (1-2 pro Gruppe)
- sterile Bechergläser (2-3 pro Gruppe)
- Pinzetten (Dumont No. 5), durch die Teilnehmer mitzubringen
- sterile Pipettenspitzen mit Spitzen (1 x blaue und 1 x gelbe Spitzen pro Gruppe)
- Parafilm
- elektrische Pipettierhelfer
- Peleusball (1x pro Gruppe)
- sterile Glaspipetten (1 x pro Gruppe)
- sterile Falcon-Röhrchen und Ständer für Röhrchen
- Ethanol-Sprühflaschen

- 2 ml Eppis, autoklaviert
- 1,5 ml Eppis, autoklaviert
- Mikroskop-Digitalkamera und Wasabi Kamera
- Feuerzeug oder Gasanzünder

**Alle Gegenstände und Lösungen müssen steril sein!!! Präparierwerkzeug in der Flamme eines Bunsenbrenners sterilisieren!**

**Gearbeitet wird (nach Präparation der Embryonen) unter einer Sterilbank.**

### 1.3.3 Lösungen und Chemikalien

Handdesinfektionsmittel Sterilium

70 % Ethanol (20 ml pro Gruppe)

Klorix (enthält 5 % Hypochlorit), zum Gebrauch mit VE-Wasser 1:5 verdünnen (ca. 10 ml pro Gruppe)

EDTA-Trypsin-Stammlösung (0,2 / 0,5 %, 500 µl pro Gruppe)

OL-PBS (250 ml pro Gruppe):

7,2 g NaCl

0,18 g KCl

1,04 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,18 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf 1 L auffüllen, pH 7,5

L15-Medium (etwa 20 ml pro Gruppe)

Glutamin (200 µl pro Gruppe)

FKS (Fötale Kälberserum, 5 ml pro Gruppe)

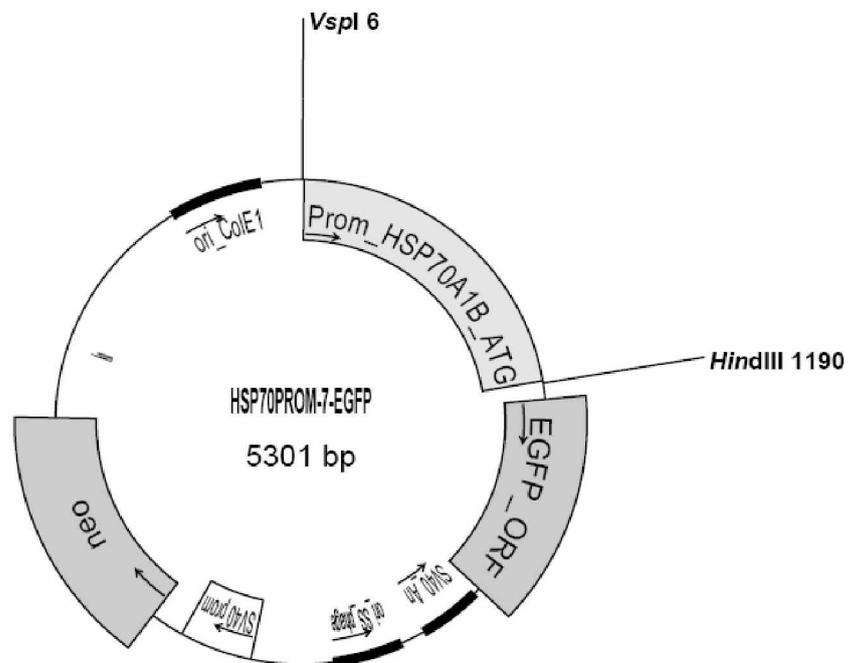
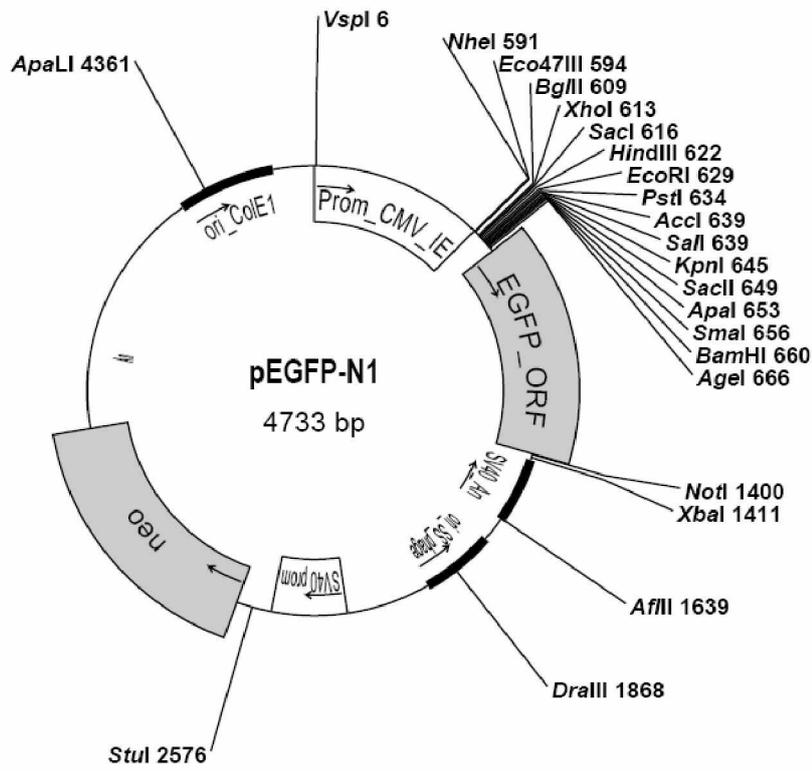
Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (GIBCO: 10000 IU/ml; ca. 500 µl pro Gruppe)

All-trans-Retinsäure (MW 300.45): 0,2 mM Stammlösung in DMSO = 0,6 mg/10 ml, bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahren, frisch ansetzen (10 ml für alle Gruppen ausreichend)

## 2 Stressnachweis durch Transfektion

Alle Zellen haben die Möglichkeit, auf ungünstige Bedingungen zu reagieren und Schutzfunktionen zu aktivieren. Die Funktion der Proteine ist für das Überleben einer Zelle essentiell. Allen Einflüssen, die eine Fehlfaltung von Proteinen verursachen können, muss daher mit geeigneten Reaktionen entgegengewirkt werden. Jede Zelle hat dafür verschiedene Möglichkeiten, aber die Hitzeschockproteine (HSPs) spielen eine entscheidende Rolle. Diese Proteine können anderen Proteinen bei der Faltung oder bei der Erhaltung ihrer räumlichen Struktur helfen. Sie werden in erhöhten Maße gebildet, wenn die Zellen Hitze, belastenden Umwelteinflüssen wie Ultraviolettstrahlung, Schwermetallen oder Oxidationsmitteln ausgesetzt wurden. In diesen Situationen stabilisieren Hitzeschockproteine zelluläre Proteine, um sie vor Denaturierung zu schützen oder beschleunigen den Abbau nicht mehr funktionsfähiger Proteine über das Proteasom.

In unserem Experiment werden wir die Synthese von Hitzeschockproteinen quantifizieren und somit einen experimentell erzeugten Stress nachweisen. Zu diesem Zweck könnte man die Menge der gebildeten HSPs (ein wichtiger Vertreter ist das HSP70) bestimmen. Einfacher und eleganter kann die zelluläre Reaktion durch Transfektion der Zellen mit einem Konstrukt gemessen werden, das ein Reporterogen unter der Kontrolle des HSP70 Promotors besitzt (siehe Abbildung). Die Menge des Reporterogenprodukts (hier EGFP: *enhanced green fluorescent protein*) ist ein Maß für die zelluläre Stressantwort.



In diesem Versuch soll die Technik der Liposomen-vermittelten Transfektion (RotiFect) zur Expression von exogenen Proteinen in einer humanen Hepatozyten Leberkrebs Zelllinie (HepG2: *human hepatocellular liver carcinoma cell line*) verwendet werden. Durch die Expression eines fluoreszierenden Genprodukts (EGFP) kann die Reaktion sowohl im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht aber auch in einem Fluoreszenz-Spektrophotometer quantifiziert werden.

## 2.1 Versuchsdurchführung

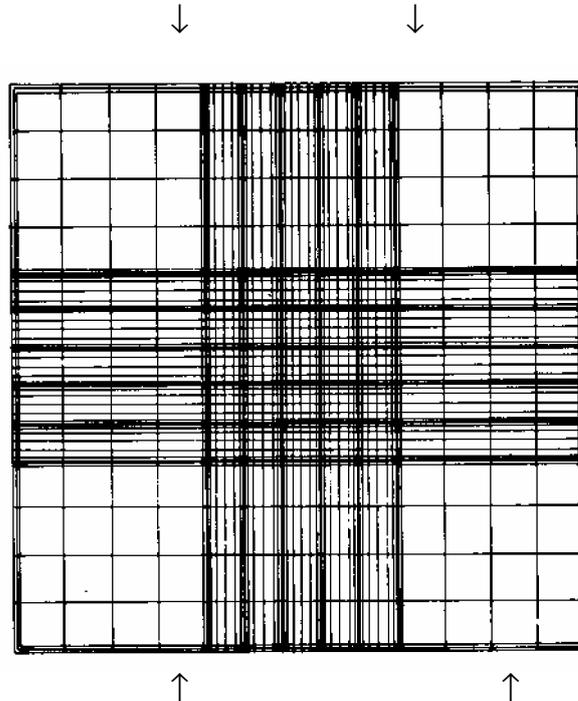
### 2.1.1 Ausbringen der HepG2 Zellen

- in ein steriles Becherglas werden 45ml RPMI 1640 Medium, 5ml FBS (fötales Bovins Serum), 500µl Gentamycin pipettiert und mittels einer 20ml Spritze und einem 0,2µm Sterilfilter (Aufsatz) in ein 50ml Zentrifugentube sterilfiltriert (= Kulturmedium)
- **jede Gruppe erhält eine 80% konfluente HepG2 Zelllinie**  
**Es wird unter der Sterilbank gearbeitet!**
- das alte Medium wird mit einer 20ml sterilen Glaspipette aus der Flasche abgesaugt und in ein Abfallgefäß überführt
- die Zellen werden 2x mit 10ml sterilem PBS gewaschen
- in die Flaschen 1ml sterilen PBS und 1ml Trypsin/EDTA (steril) pipettieren
- Flasche schwenken und für **5min** (*Nicht mehr!*) bei 37°C oder Raumtemperatur inkubieren
- Zugabe von 5ml Kulturmedium und durch Auf- und Absaugen dieser Lösungen, mit einer 5ml Pipette die Zellen vom Boden der Flasche vollständig ablösen
- die Zellsuspension in ein steriles 50ml Zentrifugenröhrchen überführen (*Rechtzeitig bereitstellen!!*)
- Zentrifugieren: 800rpm, 5min
- den Überstand mittels einer Pipette abnehmen und in ein Abfallgefäß überführen
- 1ml Kulturmedium zu dem Pellet geben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, die Zellen vereinzeln. Das ist wichtig da HepG2 Zellen sehr aneinander haften!

- Zur Zellzahlbestimmung 190 $\mu$ l Kulturmedium in ein 1,5ml Eppendorf-Tube geben und 10 $\mu$ l der Zellsuspension dazugeben und mischen.
- 10 $\mu$ l davon in eine Neubauer geben und die Zellzahl wie folgt bestimmen:

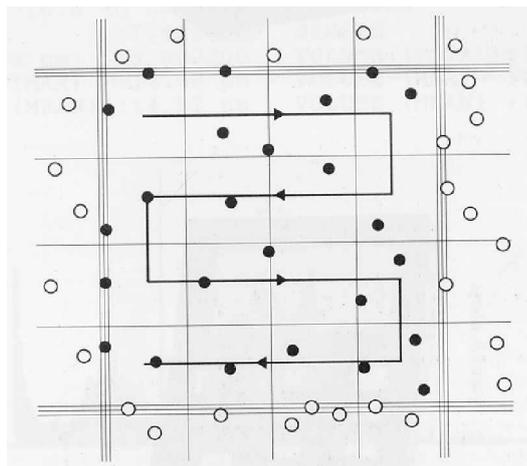
**Auszählen der Zellen in der Neubauer Zählkammer**

*Netzteilung einer Neubauer Zählkammer*



Es werden alle 4 Großquadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten ausgezählt.

**Zählweise**



**Für den Transfektionversuch und Apoptosetest werden 500 000 Zellen/ml benötigt. Stellen sie von dieser Zellsuspension 15 ml her (benötigt. Zellvolumen für 10 Wells).**

**Berechnung:**

$$\frac{\text{Anzahl Zellen in allen 4 Großquadraten} \times 20 \times 10000}{4} = \text{Zellzahl/ml}$$

Ist Zellzahl = Verdünnungsfaktor (VF)

Soll Zellzahl

V 1 (benötigtes Vol. Zellsuspension) = V 2 (abzunehmendes Vol. der ausgez. Zellzahl)

VF

**Für Versuch 2:**

1ml der  $5 \times 10^5$  Zellen in 6er Wellplatte geben (4 Wells werden belegt).

Zugabe von 1ml Kulturmedium und 24h inkubieren bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>

**Es sollte darauf geachtet werden, dass die Zellen ordentlich resuspendiert werden, damit sie nicht klumpen.**

Beschriftung der Wells:

**1 Wells: neg. Kontrolle: -DNA/+ Rotifect**

**1 Wells: Konstrukt (7): 2µg DNA HSP70-GFP-F2/R1 (7)/+Rotifect**

**1 Wells: Konstrukt (21): 2µg DNA HSP70-GFP-F2/R1 (21)/+Rotifect**

**1 Wells: Konstrukt: 2µg DNA pEGFP N1/+Rotifect**

**Für Versuch 3:**

**In die Wells der 6 Wellplatte je 1 Collagen beschichtetes Deckglas legen.**

1ml der  $5 \times 10^5$  Zellen in 3 x 6er Wellplatten geben (pro Platte 2Wells belegen)

1. Platte: Kontrollplatte 37°C
2. Platte: Brutschrank 43°C
3. Platte: Brutschrank 50°C

## 2.1.2 Liposomenvermittelte Transfektion

Alle Arbeiten sollten unter der Sterilbank durchgeführt werden.

- RPMI-Medium (ohne FBS und Gentamycin), die DNA und das Transfektionsreagenz Rotifect auf Raumtemperatur erwärmen
- herstellen folgender Lösungen in 15ml Zentrifugentubes:
  1. 2µg pro Konstrukt/DNA in 100 µl Medium (ohne Serum und Antibiotika)
  2. 40µl Rotifect in 260 µl Medium (ohne Serum und Antibiotika)
- Lösungen jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen
- Vereinen der beide Lösungen: 100 µl Konstrukt + 100 µl Rotifect, vorsichtig mischen durch Auf- und Abpipettieren
- bei Raumtemperatur 40 min stehen lassen, damit sich ein Nukleinsäure/Lipid-Komplex bilden kann.
- Waschen der Zellen 2x mit PBS
- 1,5 ml Serum- und Antibiotikafreies Medium zu den Zellen geben
- den Nukleinsäure/Lipid - Komplex zu den Zellen geben und vorsichtig mischen
- 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren
- das Transfektionsmedium abnehmen und durch 2 ml Kulturmedium mit 10% FBS und Gentamycin ersetzen
- 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren

## 2.1.3 HSP70-GFP-Induktion

- Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten: Sind Veränderungen zu beobachten (Absterben, Einschätzen der Konfluenz, Morphologie, Fluoreszenz)?
- altes Medium abnehmen und Zugabe von 2 ml Kulturmedium
- Stressfaktor: (jeweils 4 Gruppen einen Stressfaktor)
  - Temperatur: Zellen für 60 min im Brutschrank bei 43°C inkubieren
  - (alternativ: Parallel Wasserbad / andere Zeiten / andere Temperaturen)
- Danach für 1,5 - 2 h und länger im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren  
(Mittagspause und Vortrag)

### 2.1.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz (Donnerstag)

- Schätzen Sie die Anzahl an transfizierten Zellen in den jeweiligen Wells ab. Wählen Sie dazu ein geeignetes Objektiv das Ihnen eine gute Überblicksdarstellung gibt und wählen sie 3 repräsentative Bildausschnitte aus. Zählen Sie zur Ermittlung der Gesamtzellzahl die nicht fluoreszierenden und die fluoreszierenden adherenten Zellen. Berechnen sie die Transfektionseffizienz (prozentualer Anteil transfizierter Zellen an der Gesamtzellzahl).

## 2.2 Auswertung

1. Vervollständigen Sie die Angaben auf dem Formblatt. Vergleichen Sie Ihre Ergebnisse auch mit den Ergebnissen der anderen Gruppen!
2. Diskutieren Sie Ihre Ergebnisse in Hinblick auf die Wirkung der von Ihnen gewählten Stressfaktoren auf die Zellen und vergleichen Sie die Daten mit den Ergebnissen der anderen Gruppen! Interpretieren sie die Resultate!
3. Welche Erklärung haben Sie für die unterschiedliche Intensität der Fluoreszenz? Welchen Einfluss hat dieser Unterschied auf ihr Ergebnis? Welche Probleme können bei einer Transfektion auftreten und wie könnte man diese vermeiden?
4. Es gibt weitere Transformationstechniken. Nennen sie die unterschiedlichen Techniken und Wirkmechanismen!

### 2.3 Anhang

Konstrukt: \_\_\_\_\_ Stressfaktor: \_\_\_\_\_

	Gesamtzellzahl	Anzahl transfizierter Zellen	Transfektionseffizienz (in %)
Ausschnitt 1			
Ausschnitt 2			
Ausschnitt 3			
Durchschnitt	-	-	

Konstrukt: \_\_\_\_\_ Stressfaktor: \_\_\_\_\_

	Gesamtzellzahl	Anzahl transfizierter Zellen	Transfektionseffizienz (in %)
Ausschnitt 1			
Ausschnitt 2			
Ausschnitt 3			
Durchschnitt	-	-	

Konstrukt: \_\_\_\_\_ Stressfaktor: \_\_\_\_\_

	Gesamtzellzahl	Anzahl transfizierter Zellen	Transfektionseffizienz (in %)
Ausschnitt 1			
Ausschnitt 2			
Ausschnitt 3			
Durchschnitt	-	-	

## 2.4 Lösungen/Materialien

*zur Verfügung gestellt werden:*

Kulturmedium: RPMI1640 mit GlutaMAX  
10% FBS  
1 ml Gentamycin, pH 7,5, steril

RPMI1640 mit GlutaMAX, steril

PBS: (0,8g NaCl, 0,2g KCl, 0,2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,15g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,5), steril

Rotifect, Reagenz zur liposomen-vermittelten Transfektion

2 $\mu\text{g}$  DNA, HSP70Prom-7-EGFP

2 $\mu\text{g}$  DNA, pEGFP N1 (Kontrolle)

Fluoreszenzmikroskop

Brutschrank / Wasserbad 43°C

sterile blaue, gelbe und weiße Pipettenspitzen

sterile Eppendorf-Tubes

Mikropipetten

sterile Glaspipetten

6er Wellplatten

12er Wellplatten

### 3 Quantifizierung von Apoptose

Toxische Effekte von Substanzen *in vitro* kann man beispielsweise durch Messung der Inkorporation von Radioisotopen bei der DNA-Synthese identifizieren. Auch mit Hilfe der Durchflusszytometrie oder von Vitalfärbungen der Zellen, die die metabolischen Aktivitäten von lebenden Zellen anzeigen, kann zwischen vitalen und apoptotischen Zellen unterschieden werden. Zur Quantifizierung der Apoptose-induzierenden Wirkung des Hitze-Schocks werden im Rahmen dieses Versuches die Zellen mit dem an die DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (DAPI) gefärbt.

#### 3.1 Sressinduktion der HepG2 Zellen

- die 6 Wellplatten für diesen Versuch mit Parafilm umschliessen
- Je eine der 6er Wellplatte, die am Montag für diesen Versuch ausgebracht wurden, für 60 min im Brutschrank bei 43°C inkubieren / für 60 min im Brutschrank bei 50°C inkubieren und die Kontrollplatte bei 37°C belassen
- ein Referenzgefäß mit Medium dient zur Temperaturkontrolle (Temperatur überprüfen mittels Thermometer)
- danach das Medium wechseln
- die Zellen für 10min in Dapi-Färbelösung (Verdünnung: 1/500 in McIlvaine-Puffer)
- anschließend für 2 x 5 min mit TBST waschen
- Im letzten Schritt werden die Glasplättchen mit einem Tropfen Medium auf einem Objektträger fixiert und mit einem Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop, das mit einer CCD Kamera (ORCA II) ausgestattet ist, untersucht
- Es werden mindestens 100 Zellen aus jeweils nebeneinander liegenden Gesichtsfeldern ausgezählt
- Alle Zellkerne werden nach den morphologisch apoptotischen Kriterien wie Kernfragmentierung analysiert.

#### 3.2 Auswertung

- Welche Wirkung hat die gewählte Stressinduktion auf die Apoptose bzw. Zellzyklus im Bezug auf die Kontrolle?
- Vergleichen Sie die Werte der unterschiedlichen Stressinduktionen untereinander!
- Welche Stressfaktoren könnten noch in Betracht gezogen werden?

### 3.3 Lösungen/Materialien

DAPI-Färbelösung (1/500)

McIlvaine-Puffer: Sol. A: Citric acid (21,01g/l)

Sol. B: 0,2M Disodiumhydrogenphosphat (35,60g/l)

bei pH:7,5: 8,3ml Sol. A und 91,7ml Sol. B

TBST (Tris-Puffered Saline + Tween 20)

große, sterile Bechergläser mit Rührfisch

Mehrkanalpipetten

96-Well-Platten

Mikropipetten

blaue, gelbe und weiße Pipettenspitzen

50 ml und 15 ml Zentrifugenröhrchen

Bechergläser, sterile

Zentrifuge

Brutschränke

#### 4 Genexpression des Schlupfenzym vom Medaka (*Oryzias latipes*)

Lit.: Bioanalytik (Lottspeich/Zorbas); Experimentator Molekularbiologie (Mülhardt)

Nach Wakamatsu (1997), Yamagami (1972 und 1997) und Yasumasu (1992).

Wie kommt der Embryo aus dem Ei? Ein nicht ganz triviales Problem. Wie Sie sich vorstellen können, gibt es hierfür ganz unterschiedliche Möglichkeiten, etwa auf mechanische Weise oder durch enzymatische Verdauung der Eihülle.

Der folgende kleine Versuch soll demonstrieren, dass beim Medaka die letzte Variante vertreten ist. Gebildet wird das Enzym in speziellen Drüsenzellen, die zunächst nicht eindeutig lokalisierbar sind, sich aber später hauptsächlich in der Pharynxregion befinden. Experimentell konnte die Sekretion des Enzyms durch hypertonisches Medium, AC oder DC elektrische Stimulation und starken Wasserstrom über die Zellen ausgelöst werden. Der letztere Mechanismus ist möglicherweise verantwortlich für die Freisetzung des Enzyms im Embryo: Durch starke Bewegungen kurz vor dem Schlüpfen werden die Zellen mechanisch angeregt. Jedoch ist auch eine hormonelle Steuerung nicht ausgeschlossen (Ca<sup>2+</sup>-Ionophoren stimulieren die Ausschüttung des Schlupfenzym).

Eigentlich besteht das Schlupfenzym aus zwei Proteasen, die bereits gereinigt, sequenziert und kloniert worden sind (Yasumasu, 1992). Diese sind das Choriolysin L (LCE, low choriolytic enzyme) und das Choriolysin H (HCE, high choriolytic enzyme), die beide kooperativ an der Verdauung der Eihülle beteiligt sind. HCE bindet an die innere Schicht des Chorions und bewirkt durch partielle Hydrolyse ein Schwellen des Chorions. LCE hydrolysiert dann das angeschwollene Chorion. Beide Enzyme verdauen nur die innere Schicht des Chorions, wodurch das Chorion leichter mechanisch aufgebrochen werden kann. Andere Proteasen können das Chorion nicht oder nur sehr schlecht auflösen.

Die Synthese der Schlupfenzyme erfolgt als Proenzym. Die Proenzyme akkumulieren bis zum Schlupfzeitpunkt und werden kurz vor diesem aktiviert und sezerniert.

Die Differenzierung der Zellen, in denen das Schlupfenzym gebildet wird, beginnt bereits zu einem relativ frühen Zeitpunkt während der späten Phase der Gastrulation. Dies kann mit RT-PCR oder *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden.

## 4.1 Versuchsprinzip

Die Genexpression in verschiedenen Embryonalstadien soll durch RT-PCR nachgewiesen werden.

## 4.2 RNA-Isolierung

Sie benötigen je 10 –20 Embryonen Blastula-Stadium (Beschriftung: **B**), 10 x 4 Tage alte Embryonen (Beschriftung: **4**) und 5 juvenile Fische (Beschriftung: **F**) 1 Tag nach dem Schlupf. Für alle Arbeiten sind RNase freie Pistille zu benutzen. Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße müssen autoklaviert sein (oder frisch aus der Verpackung).

- Zunächst skizzieren sie die Embryonen und juvenilen Fische (Protokoll!)
- Embryonen sowie Jungfische in ein Reaktionsgefäß geben (1,5 ml, Safelock!!!) und Flüssigkeit entfernen. (Vorsicht mit geschlüpften Fischen, können leicht abgesaugt werden).
- Abnehmen der Überstände zuerst mit den blauen Spitzen und die kleine Restmenge mit weißen Pipettenspitzen

*Handschuhe anziehen! Für phenolischen Abfall (Trifast) entsprechende Abfallbehälter verwenden!:*

### **Homogenisation:**

In alle drei Safelock-Eppis 250 µl „Trifast“ geben und mit Homogenisationspistill homogenisieren (Die Gewebemenge sollte 10 % des Reagenzes nicht überschreiten!; Bei Verwendung von z.B. 500 µl Trifast sollten später auch entsprechend 100 µl Chloroform und mehr Isopropanol eingesetzt werden.

Die mit Trifast homogenisierten Proben können jetzt auch zunächst gelagert (-20°C) werden.

### **Phasentrennung:**

5 min bei Raumtemperatur inkubieren,  
plus 50 µl Chloroform,

2 x 15 Sekunden Vortex (Deckel der Eppis gut schließen),  
3 min bei Raumtemperatur stehen lassen,  
5 min bei 12 000 g zentrifugieren (4°C, **Kühlzentrifuge!**). Obere wässrige klare Phase enthält RNA.  
3 neue Safelock-Eppis beschriften: B, 4, F

### **RNA-Präzipitation:**

Obere Phase jeweils in neues Eppi überführen (Achtung! Interphase nicht mit abnehmen!),  
plus 125 µl Isopropylalkohol zur Präzipitation, **sehr gut mischen**, sonst bleiben die Phasen getrennt!!!  
20 min bei -20°C inkubieren (niedrige Temperatur beschleunigt Trennungsprozeß),  
10 min bei 10 000 rpm in Kühlzentrifuge zentrifugieren. RNA bildet sehr, sehr kleines Pellet!  
Waschen: Überstand **vorsichtig** abnehmen (erst mit blauer Spitze, dann mit kleinerer, weißer Spitze den Rest abnehmen),  
plus 250 µl 75 % kalter Ethanol 4°C (Wasser muß DEPC (Dimethylpyrocarbonat)-behandelt sein!), sehr vorsichtig mischen (Nicht vortexen, da sich das Pellet anschließend nur schlecht anheftet!),  
5 min 10 000 rpm in Kühlzentrifuge (4°C; auch bei Raumtemperatur möglich)

### **Resolubilisierung:**

Überstand wieder sehr vorsichtig, jedoch vollständig abnehmen,  
§ RNA für 5-15 min lufttrocknen, nicht länger, da eine komplette Trocknung die Solubilisierung erschwert,  
§ Zugabe von 20 µl DEPC- oder HPLC-Wasser zum Lösen der RNA,  
§ 5 min bei 65°C inkubieren (Digiblock),  
§ Lösungsvorgang eventuell durch mehrfaches Pipettieren und durch Lagerung bei -20°C oder -80°C über Nacht (oder kurzes Einfrieren der Safelock-Eppis in Flüssigstickstoff) beschleunigen  
§ **Mittagspause!**

Konzentration und  $A_{260/280}$  Verhältnis überprüfen, es sollte bei  $>1,6$  liegen. (Falls nicht, so ist eine weitere Phenol/Chloroform-Extraktion durchzuführen). Quotient aus  $A_{260}$  und  $A_{280}$  ergibt die Reinheit der RNA. Eine Absorption von 1 entspricht ca. 40  $\mu\text{g/ml}$ .

### 4.3 Bestimmung der RNA-Konzentration (*wird evtl. weggelassen*)

Die Messung erfolgt am Nanotrop durch den Kursassistenten! Alle Proben werden auf Eis gesammelt.

1  $\mu\text{l}$  der Probe wird nach Initalisierung und Messung der Referenz (TE-Puffer) gemessen. Man erhält einen Wert in  $\text{ng}/\mu\text{l}$  RNA.

(Division durch 1000 =  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Es sollen später **2  $\mu\text{g}$**  gelöste RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt werden. Berechnen Sie die benötigte RNA-Proben-Menge!

Beispieltabelle:

Messung (Photometer Helios $\gamma$ )					Berechnung		
Sampl e	Abs1 260	Abs2 280	Ratio	C = ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ )	Berechnung: $C_{\text{RNA}} =$ (C / 1000)  in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	2000 ng (=2 $\mu\text{g}$ ) absolut sollen eingesetzt werden	Berechnung RNA-Proben- Menge = $2 / C_{\text{RNA}}$  in $\mu\text{l}$
BW	(Zero base)						
B	0.153	0.085	1.8	428,4	$(428,4/1000)$ = 0.428	2	$2 / 0.428$ =4.67
4	0.186	0.093	2.001	520,8	0.5208	2	3.840
F	0.128	0.065	1.969	358,4	0.358	2	5.58

*Bemerkung:* Häufig werden die 2  $\mu\text{g}$  RNA nicht erreicht – für diesen Fall bitte alles einsetzen!

#### 4.4 Erststrang-cDNA-Synthese

Zum Nachweis spezifischer mRNAs (hier die mRNA des Low Chorionolytic Enzyme = eine Komponente des Schlupfenzym) mit Hilfe der PCR-Technologie muss die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dies ist notwendig, da die Taq-Polymerase für die Synthese von DNA nur DNA als *Template* (Ausgangs-DNA) akzeptiert. Die cDNA-Synthese erfolgt mit Hilfe einer sogenannten Reversen Transkriptase - ein Enzym, das aus Retroviren isoliert wurde. Je nach Enzym werden ausschließlich RNA-Moleküle als *Template* akzeptiert. Wie die Taq-Polymerase benötigt auch die Reverse Transkriptase für den Synthesestart einen sogenannten Primer, der homolog zu einem kleinen Stück der RNA sein muß.

Bei der vorausgehenden RNA-Isolierung wurde die gesamte RNA isoliert, die aber nur zu 1-5% aus mRNA besteht, der Rest ist rRNA und tRNA. Um spezifisch nur die mRNA in cDNA (das c steht für *copy*) umzuschreiben, verwendet man einen sogenannten Oligo-dT Primer. Dieser ist komplementär zum Poly-A-Schwanz, der charakteristisch für die mRNA ist. Alternativ können auch genspezifische Primer verwendet werden.

Da RNA starke Sekundärstrukturen bildet, müssen diese erst durch Erhitzen und anschließendes schnelles Abkühlen entfernt werden. Höhere Temperaturen sind häufig von Vorteil für die cDNA-Synthese, werden aber leider nicht sehr gut von den Reversen Transkriptasen toleriert.

#### **REAKTIONSMIX für 20 µl (!) Probenansatz (Ansatz in eines neues Eppi)**

##### **Dnase Verdau:**

2 µl 10x Dnase Puffer

1 µl Dnase I

10 µg total RNA (*bzw. 17 µl der isolierten RNA*)

(ad 10µl DEPC-H<sub>2</sub>O wenn nur der halbe Probenansatz eingesetzt wird)

Den Ansatz 15 min bei 37°C inkubieren, **danach Zugabe von 2µl 25 mM EDTA**, und Ansatz 10 min 65°C und 5 min 80°C inkubieren (letzter Schritt ist Denaturierungsschritt). Danach sofort auf Eis stellen!

Für 6 Proben- Ansätze (3x cDNA und 3x -RT): 8 ansetzen, damit der Mastermix reicht!

Volumen	Reagenz	Mastermix für 8 Proben (incl. 2 Reserve)
2 µl	RT-5x Puffer (M MuLV RT)	<b>16 µl</b>
0,4 µl	dNTP mix (12,5 mM)	<b>3,2 µl</b>
0,125 µl	RNAse Out (Invitrogen)	<b>1 µl</b> (evtl. weglassen, dann HPLC-Wasser)
0,5 µl	Oligo dT <sub>15</sub> Mix (500 ng/µl)	<b>4 µl</b>
0,5 µl	DEPC-Wasser oder HPLC-Wasser	<b>4 µl (oder 5 µl wenn kein RNAse Out verwendet wird)</b>

Auf Eis pipettieren, um Renaturierung der RNA zu vermeiden!:

**2000 ng gelöste RNA + 3,9 µl Mastermix auf ein Volumen von 10 µl ergänzen.**

**RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase** [200U/µl] (1 Eppi für alle Gr.) bereithalten und mit Ausnahme der –RT-Kontrollen je 0,5 µl pro Ansatz zupipettieren.

Beispiel-Pipettierschema (für 6 Proben in PCR-Reaktionsgefäßen (Thin-Tubes)):

Probe	Mastermix vorlegen in µl	HPLC-Wasser in µl	RNA-Probenmenge in µl (Wie unter 4.3. berechnet!)	Reverse Transkriptase (µl)	Summe µl
B	3,4	(3,9+4,7-10=-1,4) d.h. 1,4	<b>4,7</b>	0,5	10
4	3,4	2,3	<b>3,8</b>	0,5	10
F	3,4	0,5	<b>5,6</b>	0,5	10
Blindwert B (-RT)	3,4	1,4	<b>4,7</b>	+0,5 HPLC-H <sub>2</sub> O	10
Blindwert 4 (-RT)	3,4	2,3	<b>3,8</b>	+0,5 HPLC-H <sub>2</sub> O	10
Blindwert F (-RT)	3,4	0,5	<b>5,6</b>	+0,5 HPLC-H <sub>2</sub> O	10
<b>Falls ALLES eingesetzt wird (z.B. bei &lt; 2µg RNA) :</b>	3,4	0,1	<b>6</b>	0,5 RT bzw. H <sub>2</sub> O	10

**Thermocycler** mit folgendem Programm inkubieren: 10 min 37 °C (Primeranlagerung erfolgt), 1 h 42°C (Synthese), 10 min 72 °C (Enzyminaktivierung).

**Montag:** Nach Synthese cDNA-Proben und –RT-Kontrollen durch Zugabe von je 10 µl HPLC-H<sub>2</sub>O 1:2 verdünnen und ggf. bis zur Verwendung für die PCR bei -20°C lagern (besser noch bei -80°C). Hinweis: Bitte verwenden Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen **stets** neue Pipettenspitzen. Die restliche RNA lagern Sie bitte bei -20°C (besser bei -80°C).

#### 4.5 PCR

Die PCR wird nach einem Standardprotokoll unter Verwendung einer Polymerase aus *Thermus brockianus* durchgeführt. Außer der LCE mRNA wird auch noch die Expression des Aktin-Gens mit PCR nachgewiesen. Dieses Gen unterliegt nur sehr geringen Schwankungen in der Expression und kann in allen Zell- und Gewebetypen nachgewiesen werden. Es dient damit als Kontrolle für die erfolgreiche Durchführung der cDNA-Synthese und der PCR.

Zunächst wird ein Reaktionsmix für die Amplifikation von Aktin und LCE für je 15 µl Reaktionsvolumen angesetzt (Auf Eis!) :

(Anzahl: 6 cDNA-Prob.+ 6 –RT-Kontr.+ 2 H<sub>2</sub>O-Kontr.+2 genom. DNA (Positivkontr.))

Komponente	1 x Template (µl)	Reaktionsmix x 18 (incl. 2 Reserve)
Mg-solution (25 mM)	0,9 µl	16,2 µl
5x Green Go Tag Flexi Buffer	3 µl	54 µl
dNTPmix (10 mM)	0,3 µl	5,4 µl
HPLC-H <sub>2</sub> O	6,6 µl	118,8 µl
Taq-Polymerase (5U/µl) = GoTaq Flexi DNA Polymerase	0,2 µl	3,6 µl

...mischen und je 81 µl für Aktin- und LCE-Mix verwenden

Aktin-Mix für 9 Reaktionen (incl. 1 Reserve):

+13,5 µl Primer ActinMF\_F2423 (5 µM)

+13,5 µl Primer ActinMF\_R3041 (5 µM)

LCE-Mix für 9 Reaktionen (incl. 1 Reserve):

+13,5 µl Primer LCE-MF1F (5 µM)

+13,5 µl Primer LCE-MF1R (5 µM)

**Pipettierschema für PCR-Proben: (In 0,2 µl PCR-Gefäße auf Eis pipettieren!!!)**

Nr.	Probe	µl cDNA bzw. -RT-Kontr. (1:2 verdünnt siehe oben)	µl LCE-Mix	µl Aktin-Mix
	cDNA-Blastula	3	12	-
	cDNA-4 Tage	3	12	-
	cDNA 1d nach Schlupf	3	12	-
	-RT - Blastula	3	12	-
	-RT - 4 Tage	3	12	-
	-RT - 1d nach Schlupf	3	12	-
	cDNA-Blastula	3	-	12
	cDNA-4 Tage	3	-	12
	cDNA 1 d nach Schlupf	3	-	12
	-RT - Blastula	3	-	12
	-RT - 4 Tage	3	-	12
	-RT - 1d nach Schlupf	3	-	12
	Wasser-Blindwert	3 µl HPLC-Wasser	12	-
	Wasser-Blindwert	3 µl HPLC-Wasser	-	12
	genomische DNA (Positivkontrolle)	3 µl gen. DNA (oder 1,5 µl und 1,5 µl H <sub>2</sub> O)	12	-
	genomische DNA (Positivkontrolle)	3 µl gen. DNA (oder 1,5 µl und 1,5 µl H <sub>2</sub> O)	-	12

Achtung! Genomische DNA vor dem Zupipettieren nochmal kurz vortexen.

Reaktion für LCE-Proben (Cycler – Programm : Sabine-LCE)

Im Thermocycler mit folgendem Temperaturprofil inkubieren (Dauer ca. 1,5 h)

Denaturierung	94°C	3 min	} 30x
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	65°C (LCE)	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Finale Extension	72°C	5 min	

Reaktion für Aktin-Proben (Cycler – Programm: Sabine-AKTIN)

Im Thermocycler mit folgendem Temperaturprofil inkubieren (Dauer ca. 1,5 h)

Denaturierung	94°C	3 min	} 30x
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	60°C (Aktin),	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Finale Extension	72°C	5 min	

## 4.6 Gelelektrophorese

In einem Erlenmeyerkolben 1,5 g Agarose einwiegen und danach 100 ml 1x TAE-Puffer dazugeben (Für das Gel wird der 50x TAE-Puffer 1:50 verdünnt, d.h. 20 ml auf 1L dest. Wasser). Anschließend in der Mikrowelle mehrmals kurz aufkochen und schwenken (Es dürfen keine körnigen Strukturen mehr im Gel erkennbar sein!).

Gel anfärben: Noch flüssiges Gel mit 5 µl einer 1 %igen Ethidiumbromid (in H<sub>2</sub>O)-Lösung versetzen.

**Achtung: Ethidiumbromid ist ein DNA-Interkalationsfarbstoff, daher mutagen und krebserregend. Bitte unbedingt (Nitril-)Handschuhe tragen.**

Gel in die vorbereiteten Gelkammern gießen (Achtung! Ebene Unterlage verwenden.). Das Gel für ca. 60 min gelieren lassen.

1 bis 2 mal 5 µl Molekulargewichtsstandard (=Marker λ/ Pst I; Fragmentgrößen siehe Abb.) und je 15 µl PCR-Proben-Ladepuffer-Gemisch in separate Taschen des Gels auftragen.

Je 3 µl der RNA-Proben (Proben:B/4/F) mit 7 µl RNA-Auftragsmix (RNA-LP = 60 % Formamid deionisiert, 10% 10x RNA-Auftragspuffer) vermischen. RNA-Proben mit dem Auftragsmix zusammen (!! ) nochmal für 3min bei 80°C im DigiBlock oder im Thermocycler inkubieren. Ebenfalls auf das Gel auftragen. Je nach Größe des Gels die DNA bei ca. 100 V (nicht mehr, sonst „schmiert“ der Marker) für 30-60 min trennen (für RNA-Proben werden meist 80 V verwendet).

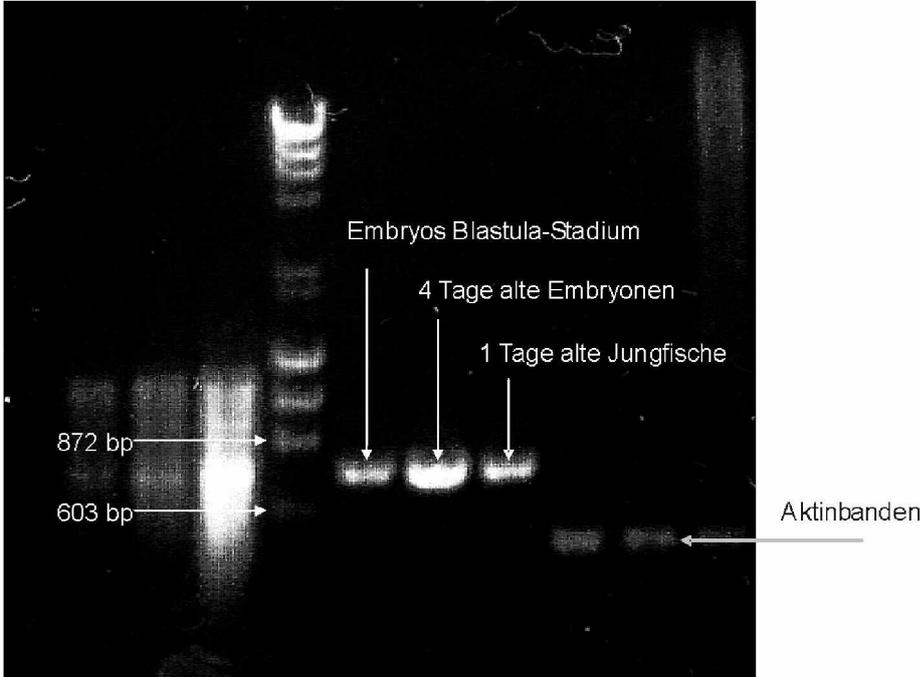
Banden durch UV-Licht visualisieren. Es werden Fotos der Gele aufgenommen. Aufnahmen so anfertigen, dass Lauffront (Primer) und Start (Taschen) sichtbar sind.

***(Jede Gruppe hat am Ende 19 Proben incl. der 3 RNA-Proben!!)***

**Gel-Beispiel:**

RNA-Proben    Marker in diesem Fall nicht  $\lambda$  Pst I sondern DNA-Hind III

|                    |



## 4.7 Protokoll

Skizzen der Embryonen und juvenilen Fische (mit Beschriftung)

Ermitteln Sie die Länge (in bp) der PCR-Fragmente über den Vergleich mit den DNA-Banden des Größenstandards (Markerspur).

Dokumentieren Sie die Ergebnisse der Gelelektrophorese! Welche Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Genexpression des Schlupfenzym (LCE) können Sie machen?

Die verwendeten Primer binden auch an genomische DNA! Können DNA-Kontaminationen das Ergebnis beeinflussen bzw. wie können Sie DNA-Kontaminationen erkennen?

Primer (5' à 3')

**ActinMF-F2423** GGC ACC ACA CCT TCT ACA ATG

**ActinMF-R3041** GAG GTA GTC TGT AAG GTC GC

Fragmentgrößen:

an genomischer DNA: 638 bp (Intron überspannt)

an cDNA: 311 bp

```

ATGGATGATGACATTGCCGCACTGGTTGTTGACAACGGATCTGGCATGTGCAAAGCTGGATTTCGCTGGAGACGAT
GCCCCCTCGTGCTGTCTTTCCCTCCATCGTTGGTCGCCCCAGGCACCAGGGTGTGCATGGTGGGTATGGGCCAGAAA
GACAGCTACGTAGGTGATGAAGCCCAGAGCAAGAGGGGTATCCTGACCCTGAAGTATCCCATTGAGCACGGTATT
GTTACCAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGAGAATTGCCCTGAGGAG
CACCTGTCTCTGCTCACTGAAGCCCCCTGAACCCCAAAGCCAACAGGGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTGAG
ACTTTCAACAGCCCTGCCATGTACGTTGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTATGCCTCTGGTCTGACTGCTGCT
ATCGTCATGGACTCTGGTGTGTTGTTGACCCACACAGTGGCCATCTACGAGGGCTACGCTCTGCCCCACGCCATC
CTGCGTCTGGACTTGGCCGGCCGCGACCTTACAGACTACCTCATGAAGATCCTGACGGAGCGTGGCTACTCCTTC
ACCACCACAGCCGAGAGGGAAATTGTCCGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAG
GAGATGGGCACCGCTGCCTCCTCTTCCCTCCCTGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCTGACGGACAGGTCATCACCATT
GGCAATGAGAGGTTCCGTTGCCAGAGGCCCTCTTCCAGCCTTCCCTTCCCTTGGTATGGAGTCTGCGGTATCCAT
GAGACCACCTACAACAGCATCATGAAGTGTGATGTTGATATCCGTAAGGATCTGTACGCCAACACTGTGCTGTCT
GGAGGTACCACCATGTACCCCGGAATCGCAGACAGAATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCACCATG
AAGATCAAGATCATTGCCCCACCAGAGCGTAAATACTCTGTCTGGATTGGAGGCTCCATCCTGGCCTCTCTGTCC
ACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCTGGCCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTC
TAA

```

**Abbildung 3:** Medaka-Aktin-cDNA Sequenz, gespliced (complete cds Accassion: s74868).

Die Primer binden sowohl an genomische DNA als auch an cDNA.

```

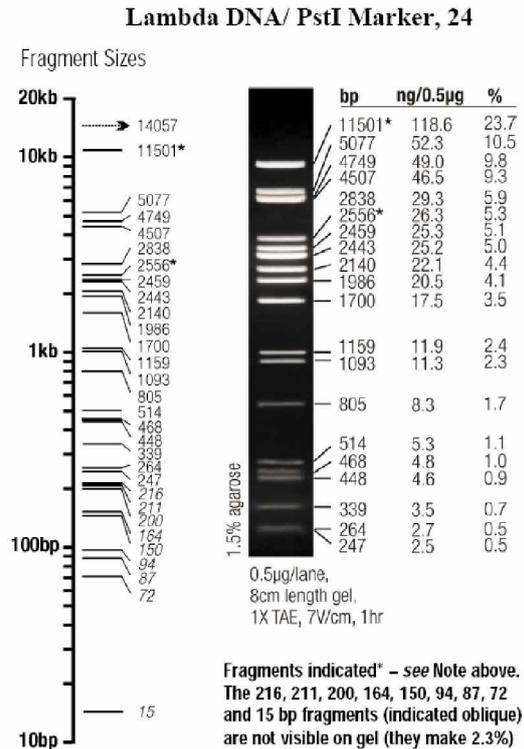
1   gtcagaagca tcagcattta aaaaaaaaaa aaaatggacc tgctggccaa agcatctgtg
61  ctgctgttgc tgctcctgag cctcagcaac gctcaaactg acaatatgga ggaagcagaa
121 aacggttcat caaaggagga aatagacgag tctgaactgg aggacgtgtc ctccatcatc
181 ttcagaatga acaacaactc tatggaggaa ctggttgaag gagatcttgt tcttcccaa
241 accaggaatg ccatgaagtg ctttggcgct ccagatagct gccgctggcc aaagtcttcc
301 aatggcatcg tgaaggttcc ttatgtggtt agcgacaact atgaaagtga cgagaaggaa
361 accattcggg acgccatgaa ggagtttgca gaaaaaacct gcattcactt tgttcctcgc
421 aacaatgaga gggcctacct gagccttgaa cccagatttg gctgcaagtc tatgatgggc
481 tatgttggtg acaacaagt ggtggtgctt cagcggtttg gctgcataaa gcacgccgtc
541 atccagcatg agctcctgca tgctctgggt ttctaccacg agcacactcg gagcgaccgc
601 gaccagcatg taaaaatcaa ctgggaaaac atcattaaag atttcacaca caactttgat
661 aagaatgata cgcacaatct gggcaccocg tatgactatg gctccatcat gcaactatgga
721 agaactgcct ttggaaaaga cagaaaggag accataaacc ccatccctaa ccccaaagct
781 gccattggcc aaacagagag gatgtcggac atcgatatac ttcgagtcaa taagctttac
841 aatgtttgag atgacatgag ctgaaaatga tatttgatgc ttcatgtggg tgtacgacat
901 taaagtgaat cggtaaaggg gagcgtttat ccttgt

```

Splicing Stellen bei bp 18, 89, 235, 352, 530, 611, 808

Fett/Unterstrichen: Primer-Sequenzen

**Abbildung 4:** Ausschnitt aus der Medaka-LCE-cDNA Sequenz. Die Primer binden sowohl an genomische DNA als auch an cDNA.



**Abbildung 5:** DNA-Größenstandard  $\lambda$ / Pst I (Marker)

#### 4.8 Materialien und Geräte

Weiß, gelbe und blaue Pipettenspitzen, (mit Handschuhen stecken, autoklavieren im Steri 1, Trockner) – je eine Box pro Gruppe

Reaktionsgefäße - Safelock direkt aus der Tüte (Vorratsgläser vorher sterilisieren (Steri 2, RNase-Freiheit nicht gewährleistet)), ca. 20 pro Gruppe

Reaktionsgefäße - 1,5 ml (siehe Pipettenspitzen), ca. 20 pro Gruppe

Reaktionsgefäße – (Safelock) 1,5 ml autoklaviert, ca. 20 pro Gruppe, 1 Glas pro Gruppe

PCR-Reaktionsgefäße (Thin Tubes), 0,2 ml, RNase-frei, 25 pro Gruppe in Zentrifugenröhrchen

Homogenisationspistills, DMPC inaktiviert, 3 St. pro Gruppe in Zentrifugenröhrchen

2 Thermocycler

Stromquelle Biometra

Midi-DNA-Gelkammern, eine reicht für 3-4 Gruppen

Abfallbehälter für Pistillen mit 70% Ethanol

## Photodokumentation

3x 500 ml Flaschen für Agarose (oder Weithalslerlenmeyerkolben)

3 Schälchen zum Abwiegen der Agarose

Spannungsquellen, 1x für 8 Gruppen

Eisboxen, 1 pro Gruppe

Ständer für Safelock-Eppis, 1 pro Gruppe

Ständer für PCR-Reaktionsgefäße, 1 pro Gruppe

Nitrilhandschuhe, normale Handschuhe

2 Abfallbehälter für phenolischen Abfall (flüssig, fest z.B. Spitzen, gegeb. Abzug)

Photometer und Laptop

Mikrowelle und Thermo-Handschuhe

Digi-Block (Temperatur) oder Wasserbad

Schwarze Küvetten

## 4.9 Lösungen

HPLC-H<sub>2</sub>O oder DEPC-Wasser (Herstellung: 1 ml DEPC in 1L dest. H<sub>2</sub>O bei 37°C über Nacht rühren bei Raumtemperatur (Abzug!), DEPC-Wasser anschließend autoklavieren,

1 ml pro Gruppe

GoTaq Flexi DNA Polymerase (5 U/μl)	4 μl pro Gruppe)	– auftauen auf Eis
5x Green Go Tag Flexi Buffer	(60 μl pro Gr.)	– auftauen bei Zimmertemperatur
Mg-solution (25 mM)	(20 μl pro Gr.)	– auftauen bei Zimmertemperatur
dNTPmix 10 mM, .	15 μl pro Gruppe	– auftauen bei Zimmertemperatur
RevertAid-Rev. Transkriptase	ca. 18 μl für alle Gr. zusamm.	– auftauen auf Eis
RT 5x Reakt.puffer	ca. 20 μl pro Gruppe	– auftauen auf Eis
Trifast zur Isolierung von RNA, DNA, Proteinen (pegGOLD TriFast Reagenz peqlab Erlangen, Bestellnr.: 30-2020),		1 ml pro Gruppe
75% Ethanol		1 ml pro Gruppe
RNase Out (Gibco),	10 μl für alle Gruppen zusammen in einem Safelock (evtl. weglassen)	
Oligo-dT Primer Mix (dT15, dT13, dT17; je 500 ng/μl; 1:1:1)		8 μl pro Gruppe (70 μl :8 Gr.)
ActinMF_F2423 (Vorwärts-Primer Sequenz: 5', GGC ACC ACA CCT TCT ACA ATG, 5 μM)		
Expression beta-actin medaka über 1 intron, auch genomisch		- 15 μl pro Gruppe

**ActinMF\_R3041** (Rückwärts-Primer Sequenz: 5', GAG GTA GTC TGT AAG GTC GC, 5 µM)

Expression beta-actin medaka über 1 intron, auch genomisch - 15 µl pro Gruppe

**LCE-MF 1F Primer** (Vorwärts-Primer Sequenz: 5' CAA AGC ATC TGT GCT GCT GTT GCT G, 5 µM) 15 µl pro Gruppe

**LCE-MF 1R Primer** (Rückwärts-Primer Sequenz: 5' TTT GGG GTT AGG GAT GGG GGT TAT G, 5 µM) 15 µl pro Gruppe

**50x TAE-Puffer (benötigt werden für 3 kleine Kammern und 3 Gele (a. 2x 24 Taschen) ca. 3L):**

121,8 g Tris-base

9,3 g Na<sub>2</sub>EDTA

18,55 ml Essigsäure

ad 500 ml H<sub>2</sub>O, pH 8,0 (mit Essigsäure einstellen)

**zur Anwendung (Gel- und Elektrophoresepuffer) 1:50 verdünnen** (20ml + 980ml dest. Wasser)

**10xLadepuffer (10 ml) – wird nur benötigt, wenn der grüne Flexipuffer nicht verwendet wird:**

Tris-HCl (1M) 2,5 ml

0,01 g Bromphenol Blau

Glyzerin (98%) 4 ml

Dest. Wasser ad 10 ml

bei 4°C lagern, 50 µl pro Gruppe

**RNA-Auftragsmix** (360 µl Formamid + 60 µl RNA-LP)

60% Formamid deionisiert

10% 10x-RNA-Ladepuffer (50mM Tris-HCl in DEPC-H<sub>2</sub>O! (pH7,6); 0,25% w/v Bromphenolblau (2,5mg/ml); 60% v/v Glycerol)

bei 4°C lagern, 30 µl pro Gruppe

**Ethidiumbromid Färbelösung 1 % in H<sub>2</sub>O** (5 µl pro kleines Gel) – 1 Eppi mit Aliquot 40µl

Agarose (electrophoresis grade)

Chloroform, 250 µl pro Gruppe

Isopropanol bzw. 2-Propanol, 500 µl pro Gruppe

} in Safelock-Eppis aliquotieren

**DNA-Marker Lambda-DNA/PstI (AUS -20°C!!-Schrank):**

300 µl Ansatz:

166,6 µl Lambda-DNA (50 µg; Eppis Tiefkühlschrank, 0,3 mg/ml, auftauen bei Raumtemp.)

30 µl 10x PstI-Puffer,

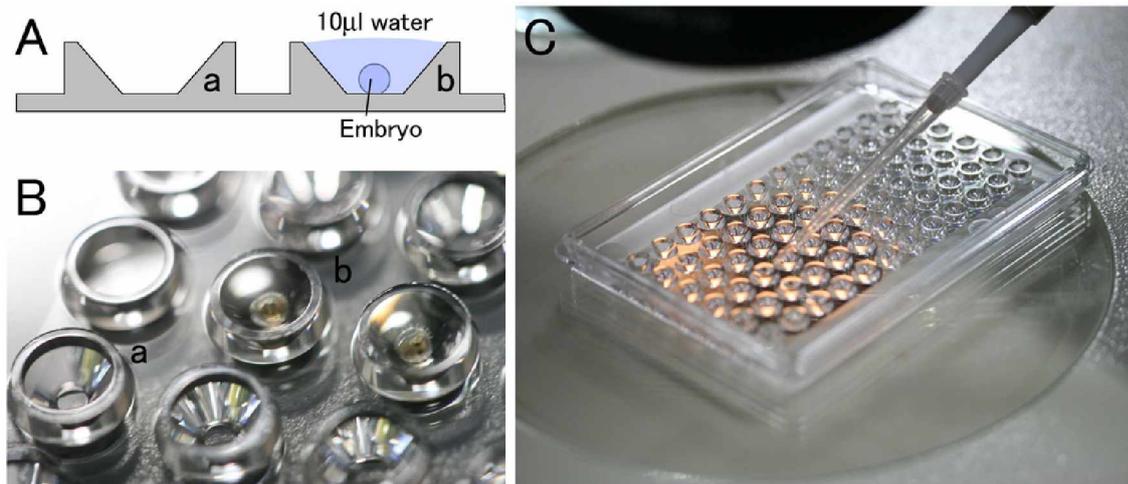
5  $\mu$ l PstI,

98,4  $\mu$ l HPLC-Wasser – Keine RNaseA!

Am besten den *Ansatz gleich zweimal* herstellen. Danach je 300  $\mu$ l mit 50  $\mu$ l 10x-Ladepuffer und 150  $\mu$ l HPLC-Wasser mischen.

## 5 Präparation des Schlupfenzym

### 5.1 Gewinnung mittels Terasaki-Platte (a)



**Abbildung 6:** (B,C) Terasaki-Platte für die Gewinnung von Schlupfenzym-Lösung. (a) leeres Well und (b) mit 10  $\mu$ l Wasser und Embryo gefülltes Well. Quelle: Kinoshita et al. (2009).

- § Befruchtete Eier gleichen Alters für 7-8 Tage in einer Petrischale inkubieren (26°C)
- § 1-3 Tage vor dem Schlupf Terasaki-Platte vorbereiten (10  $\mu$ l Wasser pro Well)
- § 7-8 Tage nach Befruchtung Eier spülen mit Embryomedium
- § Wenn die ersten Embryonen beginnen zu schlüpfen, die verbleibenden Embryonen mit Pipette in Wells überführen (abgeschnittene Spitze 1 Embryo/1 Well)
- § Inkubation bei 26°C (evtl. feucht halten mit Parafilmabdichtung)
- § JEDEN Tag Wells kontrollieren!
- § Sobald die Embryonen geschlüpft sind, Medium mit Mikropipette abnehmen und in einem Eppi sammeln (möglichst innerhalb von 24 h - sonst Rückgang der choriolytischen Aktivität)
- § Zentrifugation der gesammelten Schlupfenzym-Lösung (13 000 rpm, 10 min 4°C)
- § Überstand zur Dechorionierung verwenden und gegebenenfalls lagern bei -20°

## 5.2 Isolierung aus Embryonen-Extrakt (b)

Durch Homogenisation der Embryonen kurz vor dem Schlupf soll ein Extrakt mit chorionolytischer Aktivität gewonnen werden. Die Wirkung des Extraktes auf die Eihülle (Chorion) soll untersucht werden.

### Vorbereitung

Befruchtete Eier (mind. 100 pro Versuchsgruppe) des Medakas werden für 7-9 Tage bei 27° C in Embryomedium inkubiert (möglichst im Dunkeln auf einem Schüttler). Nicht entwickelte Embryonen aussortieren und täglich Medium wechseln.

Wenn erste Embryonen mit dem Schlüpfen beginnen (ca. 10 %), von den restlichen Embryonen das Medium abnehmen, Embryonen mit A.dest waschen, diese in fl. Stickstoff einfrieren und bis zum Beginn des Praktikums bei -80°C lagern.

Embryonen (50-100 St., je nach Verfügbarkeit) mit einem Homogenisationspistill in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 250 µl OL-PBS/100 Embryonen auf Eis homogenisieren. Über Nacht bei 4°C lagern.

Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 15 000 rpm.

Überstand abnehmen und für die Inkubation der Embryonen verwenden. Der Überstand kann für kurze Zeit bei 4°C gelagert werden. Zur längeren Aufbewahrung Aliquots von 100 µl bei -70°C lagern

## 5.3 Inkubation mit dem Embryoextrakt

Verwenden Sie Eier mit 3-5 Tage alten Embryonen zum Nachweis der Wirkung des Schlupfenzym

Ca. 10-20 Eier auf einem Zellstoffpapier mit dem Zeigefinger unter leichtem Druck rollen. Das Schlupfenzym verdaut die innere Chorionschicht. Da der Embryo im Ei sitzt, kann das von ihm gebildete Enzym ungehindert an diese Schicht gelangen, nicht so jedoch bei äußerer Anwendung. Durch das Rollen entstehen kleine Löcher in der äußeren Chorionschicht, so daß das Enzym auch bei Anwendung von außen an die innere Chorionschicht gelangen kann. Inkubieren sie je mehrere Eier (1) in 100 µl OL-PBS (Negativkontrolle) und (2) in 100 µl ihres Embryoextraktes. Die Inkubation erfolgt am

besten in einer 12x oder 24x Multiwell-Schale (Es können eine gebrauchte Multischale oder 1x 5 ml-Petrischalen verwendet werden). Geben Sie 100 µl der Enzympräparation in die Mitte der Schale und geben Sie vorsichtig mit einer Pinzette mehrere Embryonen in den Enzymtropfen (Vorsicht: nicht breit ziehen!). Danach inkubieren Sie in der abgedeckten Schale bei Raumtemperatur.

Beobachten Sie nach jeweils 5, 15, 30, 60, 90 min usw. den Effekt der Extrakte auf die Eihüllen der Embryonen. Notieren Sie ihre Beobachtungen und den Zeitpunkt des Auftretens (nach... Minuten ...). Testen Sie z.B. während der Inkubation mit der Spitze einer Pinzette die mechanischen Eigenschaften des Chorions. Quantifizieren Sie ggf. ihre Beobachtungen (Anteil der Geschlüpften o.ä.).

## Materialien

12 oder 24er Multischalen (gebraucht), 1 mal pro Gruppe

2 feine Pinzetten (von den Kursteilnehmern mitzubringen) oder feine Nadeln

Präparationsmikroskope, mit Durchlichteinrichtung (1 pro Gruppe)

Homogenisationspistille (1 pro Gruppe)

1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße

## Lösungen

Destilliertes oder entionisiertes Wasser

OL-PBS (10 ml pro Gruppe):

7,2 g NaCl

0,18 g KCl

1,04 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,18 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf 1 L auffüllen, pH 7,5

Embryomedium (50fache Stammlösung)

für 100 ml

0.5 g NaCl

0.15 g KCl

0.2 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

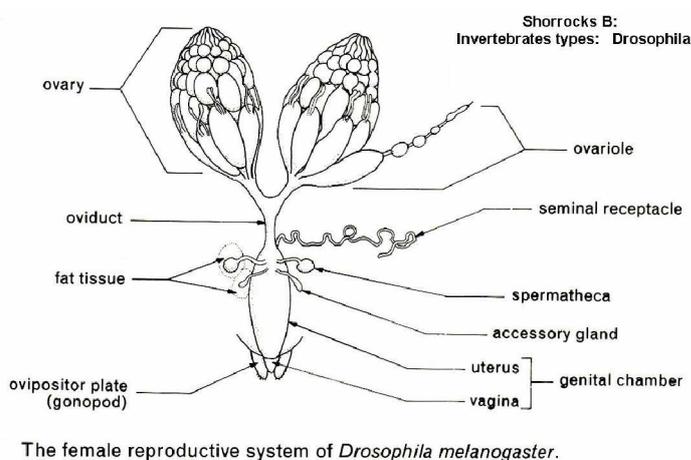
0.8 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

Zur Anwendung 50fach verdünnen und mit 0,1 % Methylenblau-Stammlösung 0,1 mL/100 mL versetzen.

## 6 Fluoreszenzmikroskopie von DNA und Mikrofilamenten an Follikeln der Taufliege *Drosophila melanogaster*

### 6.1 Theoretische Grundlagen: Oogenese von *Drosophila*

Während der Oogenese von *Drosophila* durchlaufen die Keimbahnzellen und die sie umgebenden somatischen Zellen verschiedenen Entwicklungsstadien, die sich cytologisch stark unterscheiden. An diesem Objekt kann die Polyploidisierung von Zellkernen und die Struktur der Mikrofilamente besonders eindrucksvoll im Fluoreszenzmikroskop demonstriert werden.



Die polytrophen Ovarien von *Drosophila* bestehen jeweils aus etwa 20 büschelförmig zusammenhängenden Ovariole, in denen sich die Follikel der verschiedenen Reifestadien entwickeln. Die beiden Ovidukte jedes Ovars vereinigen sich zu einem gemeinsamen Ovidukt, in das Spermathek und Receptakulum seminis münden (Abbildung 6). An dieser Stelle findet die Befruchtung statt, wenn ein reifes Ei Ovidukt und Uterus passiert und gelegt wird.

**Abb 7. Weibliches Geschlechtssystem von *Drosophila***

Jede Ovariole enthält viele Follikel in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (siehe Abb. 7 – links im Bild). Die Follikel bilden sich im Germarium an der Spitze der Ovariole. Zunächst durchläuft eine Stammzelle mit den gebildeten Tochterzellen 4 Mitosen, so dass eine Gruppe von 16 Zellen entsteht. Diese 16 Keimbahnzellen bleiben durch Cytoplasmabrücken (Fusome) miteinander verbunden und bilden so ein Syncytium. Nur eine Zelle wird zur Oocyte und durchläuft die Meiose im Verlauf der Follikelreifung. Die anderen 15 Zellen differenzieren sich zu Nährzellen und amplifizieren ihre DNA; sie werden somit polyploid und stellen Stoffe her, die über Cytoplasmabrücken in die Oocyte (Eizelle) transportiert werden. Die Nährzellen sind synthetisch hochaktiv und ermöglichen eine rasche Oogenese. Die Oocyte, die zunächst eine zentrale Position in der 16-Zell-Gruppe hat, wandert an den posterioren Pol des Follikels und wächst durch den Import der Nährzellprodukte und die Einlagerung von Dotterproteinen, die im wesentlichen aus dem Fettkörper, sehr schnell heran. Wenn die Oocyte etwa das gleiche Volumen erreicht hat wie die 15 Nährzellen (siehe skizzierten Follikel in Abb7), strömt das Nährzellzytoplasma in die Oocyte ein und die Nährzellen bilden sich zurück. Die polyploiden Kerne degenerieren und werden nicht in die Oocyte aufgenommen. Die Follikel aller Entwicklungsstadien sind stets von einem somatischen Follikelepithel umgeben, das wichtige Funktionen hat und auch bei der Festlegung der Achsen der Eizelle eine Rolle spielt. Die Follikelzellen synthetisieren auch die Eihülle (Vitellinmembran und das darüberliegende Chorion). Wenn die Follikelzellen die Synthese der Eihülle vollendet haben, sterben diese Zellen ab, so dass nur die Oocyte verbleibt. Eine

Spezialisierung der Eihülle sind die dorsalen Chorionfilamente und die Mikropyle, die Eintrittsstelle eines Spermiums bei der Befruchtung.

Die Kursteilnehmer haben die Aufgabe, Ovarien zu sezieren und einzelne Follikel zu isolieren. Nach Anfärbung von DNA und F-Aktin mit DAPI bzw. Rhodaminyl-Phalloidin sollen die Follikel im Fluoreszenzmikroskop (Abb. 8) betrachtet werden.

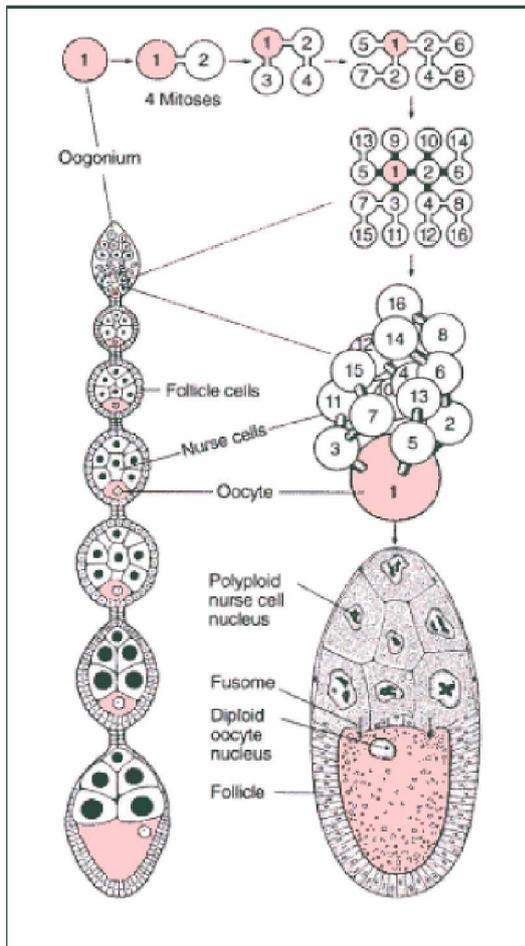


Abb. 8: Oogenese von *Drosophila*

## 6.2 Experimenteller Ablauf

### Material

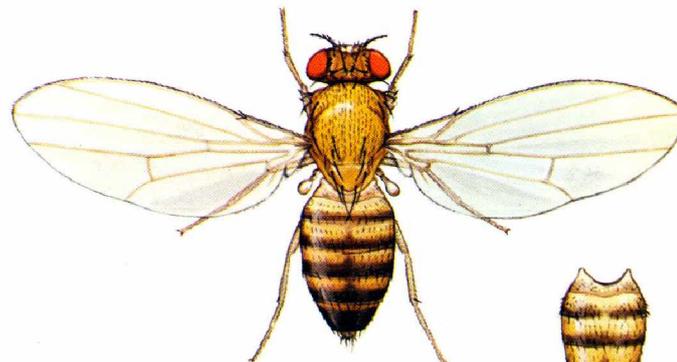
- Fluoreszenzmikroskop
- Blockschälchen (1x pro Gruppe)
- Eppendorf-Gefäße für die Phalloidin-Färbung im Dunkeln
- Pasteurpipetten
- Pinzetten
- einfache Objektträger
- Deckgläschen

**6.2.1 Narkotisieren und Identifizieren der Geschlechter**

Zum Narkotisieren der Fliegen gibt man 5-10 Tropfen Ether in ein Narkoseglas (kleines Schraubdeckelglas) oder auf den Filz eines durchbohrten Stopfens mit eingesetztem Trichter. Man verschließt das Narkoseglas mit dem Trichter und wartet bis der Ether vollständig verdunstet ist (Fliegen sterben bei direktem Kontakt mit Ether!). Der Boden des Kulturgefäßes (Fliegentube) wird auf die Handfläche oder eine weiche Unterlage gestoßen, damit die Fliegen vom Schaumstoff-Stopfen und von der Gefäßwand auf das Futter herabfallen. Der Schaumstoff-Stopfen wird entfernt und das Kulturgefäß rasch in den Trichter mit dem Narkoseglas gestülpt. Die Fliegen fallen durch den Trichter in das Narkoseglas (spätestens nach 1 min sind sie betäubt). Die Tiere schüttelt man während des Vorgangs mehrfach auf den Boden des Glases. Sobald sie bewegungslos auf dem Boden liegen, werden sie auf ein weißes Stück Papier gegeben und können nun mikroskopiert werden (Auflicht).

**Achtung: Zu lange Betäubungsdauer tötet die Tiere, der direkte Kontakt mit dem Diethylether wirkt sofort letal. Etherdämpfe sind brennbar und explosiv!**

- Die narkotisierten Tiere können unter dem Binokular auf ihr Geschlecht bzw. genetische Körpermerkmale hin untersucht werden.
- Sortieren der Tiere unter dem Binokular nach Männchen und Weibchen mit einem feinen Pinsel oder Pinzette



Shorrock's B:  
Invertebrates types: Drosophila

female

male

**Unterscheidungsmerkmale**

Weibchen	Männchen
Etwas größer als Männchen	Etwas kleiner als Weibchen
Abdomen spitz zulaufend	Abdomen rundlich
Analplatte deutlich abgesetzt	Ohne abgesetzte Analplatte
Die dunklen Ringe am Hinterleib bis zum letzten Segment getrennt	Die dunklen Ringe der letzten Segmente des Hinterleibs zu einem breiten Band verschmolzen
Kein Geschlechtskamm am Metatarsalglied des 1. Beinpaars	Geschlechtskamm aus etwa 10 kräftigen gebogenen Borsten am Metatarsalglied des 1. Beinpaars ausgebildet

**6.2.2 Versuchsdurchführung**

- Narkotisieren von *Drosophila* (nur Weibchen, siehe oben)
- narkotisierte *Drosophila* werden in ein Blockschälchen mit Robb's-Medium gegeben. Hier werden die Ovariolen und Follikel der Weibchen mit Wolframdrahtnadeln entfernt und vereinzelt!
- Vereinzelte Follikel werden mit möglichst wenig Robb's-Medium in MF-Puffer (Achtung, enthält Paraformaldehyd!) überführt und verbleiben hier für 30 Minuten zur Fixierung bei Raumtemperatur, ggf. mit MF-Puffer waschen!
- Anschließend werden die Follikel 3x in PBS gewaschen: Hierbei wird vorsichtig vom Rand des Blockschälchens her (Grenze Luft/Flüssigkeit) die Lösung mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgesaugt.
- PBS wieder abpipettieren und Phalloidin-Lösung zugeben (1 bis 2 Tropfen). Anschließend erfolgt die Färbung mit Phalloidin-Gebrauchslösung im Dunkeln (!) für 20 Minuten.
- Waschen mit PBS 3x für 5 Minuten (vorsichtig PBS absaugen).
- Kernfärbung mit DAPI-Gebrauchslösung (1-2 Tropfen) für kurze Zeit (ca. 1 min). DAPI-Lösung im Dunkeln aufbewahren !
- 3x mit PBS waschen.
- Mittels einer Pasteurpipette Objekte und PBS auf Objektträger überführen (ca. 1 Tropfen).
- als "Füsschen" Deckglassplitter verwenden. Deckglas mit Nagellack abdichten.
- Die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erfolgt unmittelbar danach.

### 6.2.3 Auswertung

1. Unterscheidung von Männchen und Weibchen
2. Isolation von Follikeln verschiedener Entwicklungsstadien. Betrachtung in der Stereolupe (Unterlicht!) bzw. im Mikroskop mit geringer Vergrößerung. Welche Zelltypen können Sie identifizieren? Warum erscheint die Oocyte im Durchlicht dunkel?
3. DNA - Färbung: welche unterschiedliche Kernmorphologie können Sie erkennen? Können Sie den Oocytenkern erkennen? Haben alle Nährzellen den gleichen Ploidiegrad?
4. Beschreiben Sie die Mikrofilamentmuster
  - a. in jungen prävitellogenen Follikeln. Die Interzellularbrücken werden auch als „Ringkanäle“ bezeichnet. Warum?
  - b. Stadium 12 Follikel (Degeneration der Nährzellen). Gibt es Mikrofilamente in den Nährzellen?

c: der Epithelialhülle, die alle Ovariolen umgibt und insbesondere an den Ovariolspitzen bei der Präparation meist erhalten bleibt

d: Skizzieren Sie Ihre Beobachtungen (1-2 ausgesuchte Stadien). Zusätzlich können Sie maximal 2 Fotos in Ihr Protokoll aufnehmen.

#### 6.2.4 Lösungen und Materialien

##### Robb's BBS

(1 Teil A + 1 Teil B + 2 Teile H<sub>2</sub>O):

<b>Lösung A:</b>	Endkonz. (M/L)	g/250ml
NaCl	$5,2 \times 10^{-2}$	3,04
KCl	$4,0 \times 10^{-2}$	2,98
Glucose x H <sub>2</sub> O	$1,0 \times 10^{-2}$	1,98
Sucrose	$1,0 \times 10^{-1}$	34,23
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	$1,2 \times 10^{-3}$	0,30
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	$1,2 \times 10^{-3}$	0,24
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	$10 \times 10^{-3}$	0,15

(Ca separat lösen)

##### Lösung B:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	$2,0 \times 10^{-3}$	0,72
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	$3,7 \times 10^{-4}$	0,05

Mit 0,1 N NaOH auf pH 6,8 einstellen

##### Ether

##### MF-Puffer: für 100 ml:

20mM Pipes	0,6 g
80mM KCl	0,6 g
5,6 mM Glucose	0,10 g
1,5 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,03 g
1,5 mM Ca Cl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,022 g
10mM EGTA	0,38 g

pH 7,2 mit KOH einstellen, 4 g Paraformaldehyd bei 60 °C in MF gelöst, danach 200 µl Triton X-100 hinzufügen, vorsichtig rühren

##### PBS (für 1 L):

8,5 g NaCl  
 0,36 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 3,72 g Na<sub>2</sub>H PO<sub>4</sub>  
 mit aqua dest. auf 1 L auffüllen, pH auf 7,4 einstellen

**Rhodaminyl-Phalloidin: 0,3 µg/ml PBS** [50 µl Stammlösung + 500 µl PBS]

**DAPI-Gebrauchslösung (0,2 µg/ml PBS):** Stammlösung (1mg/ml in DMSO) in PBS x 5.000 verdünnen [1 µl Stammlösung enthält 1 µg DAPI; mit 5 ml PBS auffüllen]

##### Phalloidin

Phalloidin (sehr giftig!!) ist eine aus Knollenblätterpilzen gewonnene Substanz, die spezifisch an F-Aktin bindet (Prinzip der Giftwirkung!). Nach Konjugation dieser Substanz mit Rhodamin kann die Substanz eingesetzt werden, um Mikrofilamente im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Der DNA -bindende Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der für die Darstellung der Kerne eingesetzt wird, unterscheidet sich vom Rhodamin bezüglich der Absorptions- und Emissionswellenlängen, so dass eine zweifarbige Darstellung im Fluoreszenzmikroskop möglich ist.

## 7 Umstrukturierung der Eihülle beim Medaka nach Befruchtung

Die Eier der Teleostier sind von einer mehr oder weniger dicken azellulären Schicht, dem Chorion oder der *Zona radiata*, umgeben. Diese Eihülle dient dem Schutz der Eier. Fische, die vivipar oder maulbrütend sind, weisen dünnere Eihüllen auf als solche, deren Eier beispielsweise der Brandung ausgesetzt oder in Kiesbetten abgelaicht werden.

Die Eihülle wird während der Oogenese um die Oocyten gebildet. Sie weist bei fast allen Fischen einen Aufbau aus zwei Schichten, der *Zona radiata externa* und der *Zona radiata interna*, auf. Der Schutz des Embryos wird überwiegend durch die *Zona radiata interna* gewährleistet. Diese besteht überwiegend aus Proteinen, die, je nach Fischart, sowohl von den Follikelzellen als auch von der Leber gebildet werden können.

Die Eihülle stellt bei reifen Oocyten eine für Spermien undurchdringliche Barriere dar. Diese wiederum müssen, um die Oocyte befruchten zu können, die Eihülle am animalen Pol durchwandern, was durch die Mikropyle ermöglicht wird. Die Befruchtung wiederum führt zur Aktivierung der Eier. In wenigen Minuten ändert sich die Struktur und damit Festigkeit der Eihülle. Die Eihüllproteine der *Zona radiata interna* sind an diesem Prozeß beteiligt, der als "hardening" bezeichnet wird.

Dabei werden die Eihüllproteine durch verschiedenen Enzyme prozessiert, d.h. zum Teil erst verkürzt und danach miteinander verknüpft. Es handelt sich dabei im wesentlichen um kovalente Bindungen. Allerdings können auch Disulfidbrücken eine Rolle spielen, das ist allerdings bei *Medaka* noch wenig erforscht.

Bei den oviparen Salmoniden, die in Laichgruben über Kies laichen und ihre Eier nach der Befruchtung mit Kies bedecken, können unbefruchtete Eier mit maximal 4 g belastet werden. Befruchtete Eier dagegen halten ein Gewicht von etwa 3,5 Kg aus (bei einem Eidurchmesser von etwa 4-5 mm) (Riehl, 1995).

In diesem Versuchsteil werden zum einen unbefruchtete, zum anderen befruchtete Oocyten des Medaka mittels SDS-PAGE untersucht, um die Umstrukturierungen der Eihülle im Rahmen der Aktivierung darzustellen.

Für die Aktivierung der Eier eignen sich auch Calcium-Ionophoren wie der Ionophor A23187 (warum?). Diese sind aber sehr teuer und auf die Verwendung im Praktikum soll daher verzichtet werden.

## 7.1 Versuchsprinzip

Von unbefruchteten und befruchteten (möglichst frühe Stadien, 4-64 Zellen) Oocyten des Medaka wird das Chorion abpräpariert und für die SDS-PAGE aufgearbeitet.

## 7.2 Gewinnung befruchteter Eier

Adulte Männchen und Weibchen werden paarweise bei 27 °C und 16/8 h hell/dunkel Rhythmus gehalten. Bei Gegenwart eines Männchens legen die Weibchen innerhalb von 30 min nach Start des Lichtzyklus Eier. Sie bleiben in der Analregion des Weibchens angeheftet und werden dort vom Männchen befruchtet. Um zu demonstrieren, dass die Aktivierung bereits kurz nach der Befruchtung eingetreten ist, werden einerseits aus Weibchen präparierte unbefruchtete Eier verwendet andererseits werden aber auch möglichst frühe Eistadien (2h nach Befruchtung) untersucht. Nach der Eiablage haften die Eier in der Analregion des Weibchens. Von hier können Sie einfach mit der Hand oder einer umgebogenen Präpariernadel entfernt werden (Vorsicht! Frisch befruchtete Eier sind sehr labil!)

## 7.3 SDS-PAGE: Vorbereiten des Gels

Die Glasplatten für die Gelelektrophorese werden mit Aceton gereinigt, der Abstandhalter wird zwischen die Glasplatten gelegt und die Platten mit Klammern zusammengehalten. Das Trenngel wird in diese Gelkammer gegeben. Mit einer Pasteurpipette wird vorsichtig Wasser auf das Trenngel gegeben (keine Luftblasen!)

Nach Polymerisation des Trenngels wird das Sammelgel aufgetragen. Der Probenkamm wird in das Sammelgel gesteckt und nach Polymerisation des Sammelgels wieder entfernt. Die Gelkammer wird in die Elektrophoresekammer gestellt. Elektrophoresepuffer wird in die Elektrophoresekammer gegeben.

## 7.4 Präparation der unbefruchteten Eier

Jede Gruppe präpariert 1-2 Weibchen je nach Anzahl der Eier. Eier die nicht mehr gebraucht werden, werden an andere Gruppen weiter gegeben. Der Fisch wird mittels 0,1%igen Benzocain-Lösung getötet und auf einer Wachsschale mit Präpariernadeln fixiert. Der Bauchraum wird an der Unterseite vom After zum Kopf vorsichtig geöffnet.

Die Eier sind gut zu erkennen und werden komplett entnommen. Reife Eier sind durchsichtig, rund und groß. Sie werden in eine Petrischale mit Ringerlösung gegeben, 10 Oocyten werden benötigt, und das Chorion wird zwei spitzen Pinzetten abpräpariert (Blockschälchen oder kleine Petrischalen), Dotterreste werden sorgfältig abgespült.

Das Chorion wird in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße mit 100 µl Ringerlösung gegeben. Danach zentrifugieren bei 10000 rpm für 2 min. Die Ringerlösung entfernen (Abspülen eventueller Dotterreste), durch 60 µl 50 mM Tris-HCl, pH 6,8 ersetzen und beschallen (Ultraschall).

## 7.5 Präparation des Chorions der befruchteten Eier

Von je 10 Oocyten wird das Chorion in Ringerlösung mit zwei spitzen Pinzetten abpräpariert (Blockschälchen oder kleine Petrischalen). Dotterreste werden sorgfältig abgespült. Das Chorion wird in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße mit 100 µl Ringerlösung gegeben. Danach zentrifugieren bei 10000 rpm für 2 min. Die Ringerlösung entfernen (Abspülen eventueller Dotterreste), durch 60 µl 50mM Tris-HCl, pH 6,8 ersetzen und beschallen

## 7.6 Präparation von Dotterproteinen

Da die Präparationen des Chorions mitunter von Dotter kontaminiert sein können, sollten als Vergleich auch Dotterproteine aufgetragen werden. Hierdurch können Chorion-spezifische Banden besser identifiziert werden.

5 Eier (2 h nach Befruchtung) mit einem Homogenisationspistill und 60 µl 50mM Tris-HCl, pH 6,8 in einem 1,5 ml Eppi homogenisieren.

1 min bei 5000 rpm zentrifugieren.

Überstandes ohne Chorionbruchstücke abnehmen.

## 7.7 Proteinbestimmung nach Bradford

### *Eichkurve:*

In eine 96-Well-Mikrotiterplatte (eine für alle Gruppen) wird eine Eichreihe mit einer Protein-Standard-Lösung der Konzentrationen 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 und 0,8 mg/ml angelegt. Als Protein-Standard wird eine BSA-Lösung verwendet.

### *Erstellung einer Verdünnungsreihe:*

50 µl dest. Wasser in fünf beschriftete 1,5 ml Eppendorfgefäße vorlegen und in ein sechstes Gefäß 100 µl einer BSA-Lösung mit einer Proteinkonzentration von 0,8 mg/ml pipettieren. 50 µl der höchsten Proteinkonzentration mit einer Pipette entnehmen und in das Eppendorfgefäß für die 0,4 mg/ml Konzentrationsstufe geben und mit dem bereits hinzugegebenen 50 µl dest. Wasser gut mischen. Anschließend aus dieser Verdünnung 50 µl entnehmen und in das Gefäß mit der nächst geringeren Verdünnungsstufe (0,2 mg/ml) geben usw. Dieser Vorgang wird bis zur Konzentration 0,025 mg/ml wiederholt.

### *Messung:*

1. Zur Ermittlung des Blindwertes werden jeweils 10 µl dest. Wasser in die ersten 3 Kammern der Mikrotiterplatte gegeben (LW = Leerwert A1 bis A3)
2. Für jede Proteinkonzentration (Eichproteinlösung und Proben) werden in je drei aufeinander folgende Kammern der Mikrotiterplatte 10 µl pipettiert (A4 bis B9)
3. In jede Kammer wird anschließend 250 µl des BRADFORD-Reagenz gegeben
4. Die optischen Dichte wird nach 30min gemessen

## 7.8 Gelelektrophorese

Eine Proteinkonzentration von 2µg/µl einstellen und Zugabe von 2µl 6x Probenpuffer zu 10µl Probe.

**Denaturierung:** Proben kurz zentrifugieren und 5 min auf 95 °C erhitzen. Nochmals zentrifugieren (zur Vermeidung des Aufspringens der Probengefäße mit einer kleinen Nadel ein Loch in den Deckel stechen).

10 µl der Proben werden auf das vorbereitete Gel aufgetragen. Protein-Größenmarker werden ebenfalls aufgetragen (10 µl in separate Taschen!, bei Verwendung des Biorad-

Markers: 5  $\mu$ l des Markers mit 5  $\mu$ l des 2xSDS-Probenpuffers mischen, 5 min denaturieren und auftragen).

Die Trennung erfolgt bei 18 - 20 mA für 1,5-2 h (Bei mehreren Gelen die Amperezahl entsprechend erhöhen!) bis kurz vor dem Austreten des Farbmarkers.

Nach der Elektrophorese werden die Gele aus den Kammern entnommen (Strom vorher abschalten!). Jetzt werden die Gele für 30 min in Coomassie gefärbt.

Das Entfärben erfolgt mit Entfärber, der 3 x im Abstand von 30 min gewechselt wird.

Entfärber über Aktivkohle regenerieren!

Gele scannen und im Gelrockner trocknen.

## 7.9 Zusammensetzung der Gele

(Angaben für jeweils ein Gel)

Die Lösungen entsprechend der Tabelle zusammenmischen. Das Sammelgel erst herstellen, wenn das Trenngel polymerisiert ist (dauert 30-60 min). Bitte Vorsicht beim Umgang mit Acrylamid. **Nicht polymerisiertes Acrylamid ist sehr neurotoxisch!!!**

### Trenngel (12%) für 2 Minigele:

Acrylamid/Bisacrylamid Mix	10,8 ml (Kühlschrank)
1M Tris/HCl pH=8.8!!	7.5 ml
dest. Wasser	1.4 ml
10% SDS	200 $\mu$ l
10% Ammonium Persulfat	100 $\mu$ l (immer frisch in ein Eppi abwiegen: 20mg/200 $\mu$ l)
TEMED (unterm Abzug)	10 $\mu$ l (zum Schluß!!)

### Sammelgel (4.8% Acrylamide) für 2 Minigele:

Acrylamid/Bisacrylamid Mix	2 ml
1M Tris/HCl pH = 6.8!!	1.25 ml
dest. Wasser	5.6 ml
10% SDS	100 $\mu$ l
10% Ammonium Persulfat	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l (zum Schluß!!)

## 7.10 Materialien

Kleine Petrischalen (1-2 pro Gruppe)  
Große Petrischalen (~15 cm Ø, 1 pro Gruppe)  
Präparierbesteck einschließlich Pinzetten und Mikroschere, durch die Teilnehmer mitzubringen  
Bechergläser (für die Gelvorbereitung)  
1,5 ml Eppendorf-Gefäße,  
Gelelektrophoresekammer und Spannungsquelle  
Schüttler  
Geltrockner  
Zentrifuge  
Plattenreader(Photometer)

### Lösungen

#### Medaka-Ringerlösung (10x Stammlösung)

NaCl	7,5 g/100 ml-
KCl	0,2 g/100 ml
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,2 g/100 ml
NaHCO <sub>3</sub>	0,02 g/100 ml

pH 7.3

Zum Gebrauch 1:10 verdünnen, davon 100 ml pro Gruppe

Protein-Größenmarker 12-78 kD, 10 µl pro Gruppe

50mM Tris-HCl, pH 6,8

#### Bradford-Reagenz

100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 in 50 ml 95 % Äthanol lösen, 1 h rühren  
100 ml 85 % ige Phosphorsäure zugeben  
mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen

0,8mg/ml BSA

6 x Probenpuffer: \_\_\_\_\_

3 % Glycerin

1,5 ml Mercaptoethanol

0,6 ml Wasser, dest

Bromophenolblau

Acrylamidstocklösung (Fertiglösung von Roth) L1:

30 % Acrylamid

0,8 % Bisacrylamid

Trenngelpuffer L2:

18,17 g Tris

0,4 g SDS

pH 8,8

ad 100 ml

Sammelgelpuffer L3:

6,06 g Tris

0,4 g SDS

pH 6,8

ad 100 ml

Probenpuffer (2x) L4 (100 µl pro Gruppe):

1 ml 0,6 M Tris-Puffer pH 7,8

0,24 g SDS

1,5 ml Glycerin 87 %

0,5 ml Mercaptoethanol

50 µl Bromphenolblau 0,25 %

ad 10 ml

APS (Ammoniumperoxidisulfat) L5: 10 %

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Tris-Puffer L6:

7,5 g Tris

pH 7,8

ad 100 ml

Elektrophoresepuffer-Stammlösung L7:

115 g Glycin

24 g Tris

pH 8,5

ad 1000 ml

Elektrophoresepuffer-Gebrauchslösung L8 :

50 ml Stocklösung

0,8 g SDS

350 ml A.dest.

pro Minigelkammer mit 2 Gelen werden ca. 400 ml benötigt

Coomassie Färbelösung L10 (100-200 ml pro Gruppe):

227 ml Ethanol

227 ml H<sub>2</sub>O

46 ml Essigsäure

1,25 mg Coomassie Brilliant Blue R250

Entfärber (250-500 ml pro Gruppe):

375 ml Ethanol

120 ml Essigsäure

1500 ml H<sub>2</sub>O

## 8 Hinweise zur Anfertigung der Protokolle

Die Protokolle sollen für jeden Versuch kurz in der Form Versuchsbeschreibung/Einleitung, Ergebnisse (Originaldaten sowie berechnete Werte, übersichtlich in Tabellenform; Beschreibung der Ergebnisse) und Diskussion aufgebaut sein.

### Versuchsbeschreibung/Einleitung

Verzichten Sie auf eine ausschweifende Einleitung und insb. auf die Wiederholung des Skripts! Nennen Sie nur kurz den Versuch und die durchgeführten Messungen. Erläutern sie gegf. Änderungen gegenüber dem Skript.

### Ergebnisse

Stellen sie die Ergebnisse übersichtlich dar. Um die Korrektur zu erleichtern, sollten auch die Originaldaten (z.B. RNA-Konzentration) tabellarisch dargestellt werden. Die berechneten für den Versuch relevanten Ergebnisse sollten in geeigneter Weise graphisch dargestellt werden. *Zu jeder Graphik und Tabelle gehört eine Beschreibung und Legende, die das Verständnis ermöglicht.* Überlegen sie, welche Angaben notwendig sind, um einem Außenstehenden das Verständnis der dargestellten Daten zu ermöglichen.

### Diskussion

Diskutieren sie kurz die Ergebnisse, insbesondere im Zusammenhang mit der Zielstellung. Interpretieren sie die gemachten Beobachtungen. Wenn die Ergebnisse nicht ihren Erwartungen entsprechen, überlegen sie warum. Falls der Versuch nicht gelingt, diskutieren sie die möglichen Fehlerquellen.

## 9 Literatur

### Allgemeine Literatur:

- [Alberts B et al. 1997](#). Molekularbiologie der Zelle. VCH, Weinheim.
- [Mülhardt C, 2000](#). Der Experimentator: Molekularbiologie. Spektrum akademischer Verlag Gustav Fischer, Heidelberg (Bibliothekssignatur Wasserwesen: WC 4150 M946).
- [Seyffert W, Balling, R 1998](#). Lehrbuch der Genetik. Gustav Fischer, Stuttgart.
- [Wehner R, Gehring W 1995](#). Zoologie. Thieme Verlag, Stuttgart.
- [Wolpert L, 1999](#). Entwicklungsbiologie. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg.

### Spezielle Literatur:

- [Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI, 1995](#). Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. Dev. Biol. 168, 342-57.
- Dennis JL, Mutwakil MHAZ, Lowe KC, dePomerai DI, 1997. Effects of metal ions in combination with a non-ionic surfactant on stress responses in a transgenic nematode. Aquat. Toxicol. 40: 37-50.
- Gutzeit HO, 1990. Die Entwicklung der Eihülle bei Insekten. BIUZ 1: 33-41.
- [Gutzeit HO, 1990](#). The microfilament pattern in the somatic follicle cells of mid-vitellogenic ovarian follicles of *Drosophila*. Europ J Cell Biol 53: 349-356.
- Gutzeit HO, 1992. Organization and in vitro activity of microfilament bundles associated with the basement membrane of *Drosophila* follicles. Acta histochemica, Suppl. XLI: 201-210.
- Gutzeit HO, von Seydlitz-Kurzbach E, Neuschroer R, 1993: How *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) follicles become spatially organized and obtain their ovoid shape. Int J Insect Morphol & Embryol 22 (2-4): 335-347.
- Guven K, Duce JA, dePomerai DI, 1994. Evaluation of a stress-inducible transgenic nematode strain for rapid aquatic toxicity testing. Aquat. Toxicol. 29: 119-137.
- Hamazaki, T, Murata, K, 1992. What is the main organ, liver or ovary, by which the components of the egg envelope are produced in fish? The Fish Biology Journal MEDAKA 4, 19-25.
- Iuchik, I, Ha, C-R, and Matsuda, K., 1995. Chorion hardening in medaka (*Oryzias latipes*) egg. The Fish Biology Journal MEDAKA 7, 15-20.

- Kinoshita, M., Murata, K., Naruse, K., Tanaka, M. 2009. Medaka – biology, management, and experimental protocols. Wiley-Blackwell.
- Ladygina T, Wakamatsu, Y, 1999. Chromosome preparation from the medaka, *Oryzias latipes*, at the different stages of development. The Fish Biology Journal MEDAKA 10, 33-34
- Lehmann J, 1991. Der Körperbau der wichtigsten mitteleuropäischen Süßwasserfische. Ein Leitfaden. Landesanstalt für Fischerei Nordrhein-Westfalen, Kirchhundem-Albaum
- [Lindsley DL, Zimm GG, 1992](#). The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- [Murata K, Sugiyama, H, Yasumasu, S, Iuchi, I, Yasumasu, I, and Yamagami, K, 1997](#). Cloning of cDNA and estrogen-induced hepatic gene expression for choriogenin H, a precursor protein of the fish egg envelope (chorion). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 2050-2055.
- Riehl, R, 1995. Die Eier und Eihüllen von Knochenfischen. In: [Greven, H. und Riehl, R. \(Hrsg.\): Fortpflanzungsbiologie der Aquarienfische. Symposiumsband](#). Birgit Schmettkamp Verlag, Bornheim
- Wakamatsu, Y (1997): Preparation of medaka hatching enzyme. The Fish Biology Journal MEDAKA 9, 49-50.
- [Westerfield M, 1994](#) The zebrafish book : a guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*)
- Yamagami K (1997): A short history of the hatching enzyme studies in medaka. The Fish Biology Journal MEDAKA, 9: 5-15.
- Yamagami, K (1972): Isolation of a choriolytic enzyme (hatching enzyme) of the teleost, *Oryzias latipes*. Developmental Biology 29, 343-348.
- [Yasumasu S, Yamada K, Akasaka K, Mitsunaga K, Iuchi I, Shimada H, Yamagami K, 1992](#). Isolation of cDNAs for LCE and HCE, two constituent proteases of the hatching enzyme of *Oryzias latipes*, and concurrent expression of their mRNAs during development. Dev. Biol. 153, 250-8.