

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 ANZUCHT DER PFLANZEN

Nicht sterilisierte Samen von *Nicotiana tabacum* kamen im Gewächshaus auf Pikiererde P (Patzner) innerhalb einer Woche zur Auskeimung. Die Pflanzschale wurde dabei mit einer Glasscheibe abgedeckt, um die unbedeckten Samen vor Austrocknung zu schützen. Nach insgesamt 2 Wochen wurden die jungen Pflanzen in eine größere Schale pikiert. In der folgenden dreiwöchigen Anzuchtphase wurden die Pflanzen täglich für 16 h mit einer Hochdruck-Natriumdampflampe (PHILIPS) bei einer Beleuchtungsstärke von 60 klx beleuchtet. Die Temperaturen lagen im Tagesrhythmus zwischen 10°C in der Nacht und 26°C am Tag. In der anschließenden Wachstumsphase wurden die Pflanzen in Tontöpfe mit Topferde vereinzelt. Die Beleuchtungsstärke und -dauer wurde beibehalten. Die Blüte wurde im Alter von 3 - 4 Monaten erreicht.

2.2 VERFAHREN MIT RIBONUKLEINSÄUREN (RNA)

2.2.1 ISOLATION VON GESAMT-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte durch eine selektive RNA-Präzipitation mittels LiCl. Ausgehend von 10 g Frischgewicht an pflanzlichem Material konnte mit dieser Methode bis zu 5 mg Gesamt-RNA isoliert werden. Alternativ wurde eine weniger zeitintensive Präparation mittels Säulenchromatographie angewendet.

2.2.1.1 LITHIUMCHLORID-METHODE

(modifiziert nach Sokolovsky *et al.*, 1990)

Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff fein gemörsert und in einen vorbereiteten SS34-Zentrifugenbecher mit einem 1:1 Gemisch aus Lysis-Puffer (s.u.) und Phenol/Chloroform (1 ml je g Frischgewicht) überführt. Die Suspension wurde für 30 min durchmischt (Über-Kopf-Schüttler) und anschließend 10 min bei Raumtemperatur und 10.000 Upm (SS34-Rotor, Sorvall) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und mit 0,75 Volumen einer 8 M LiCl-Lösung versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurde die präzipitierte RNA durch Zentrifugation gewonnen (s.o.) und in einem geeignetem Volumen bidest. Wasser mit DEPC-Zusatz (s.u.) gelöst. Durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen eiskaltem 98 % Ethanol wurde die RNA bei -20 °C für 2 h oder bei -80 °C für 30 min gefällt. Der Ansatz wurde anschließend für 10 min bei 4 °C zentrifugiert (s.o.), das Sediment mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst.

<u>Lysis-Puffer:</u>	0,6 M NaCl 10 mM EDTA 10 mM Tris pH 8,0 4 % SDS
<u>DEPC-Wasser:</u>	100 µl DEPC (Sigma) in 1.000 ml bidest. Wasser

DNase-Behandlung:

Um mögliche Verunreinigungen der RNA-Präparation mit DNA zu eliminieren, wurde eine RNase-freie DNA-spezifische Nuklease verwendet. Dazu wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 50 µg Gesamt-RNA mit 5 µl 10 * PCR-Puffer (Boehringer-Mannheim) und 40 Einheiten (U) RNase-Inhibitor (MBI Fermentas) versetzt und das Reaktionsvolumen mit RNase-freiem Wasser auf 49 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 27 U DNase (Boehringer-Mannheim) wurde der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden je 20 µl Phenol (Fluka) und Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) zugesetzt und 1 min gut durchmischt (Vortex). Die Phasen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 Upm getrennt und die obere Phase zweimal mit einem identischen Volumen Chloroform extrahiert. Die so behandelte RNA wurde durch eine Ethanolfällung wie oben beschrieben gewonnen.

2.2.1.2 SÄULENCHROMATOGRAPHIE

(RNeasy, Qiagen)

Dieses Verfahren beruht auf der selektiven Bindung von einzelsträngigen Nukleinsäuren an eine Silikamembran. Hierzu wurde ein Säulensystem der Firma Qiagen verwendet und dieses entsprechend den Angaben im Herstellerprotokoll eingesetzt. Zunächst wurde das Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff fein gemörsert, je 100 mg des feinen Pulvers in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 450 µl Lysis-Puffer versetzt. Nach gründlichem Durchmischen und einer Inkubation für 10 min bei 60 °C wurde das Lysat auf eine QIAshredder-Säule gegeben und 2 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 225 µl 98 % Ethanol versetzt und auf eine RNeasy Zentrifugen-Säule aufgetragen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 15 min bei 8.000 Upm wurde die Säule hintereinander mit 700 µl Puffer RW1 und dann zweimal mit je 500 µl Puffer RPE gewaschen. Der Durchfluss wurde stets entfernt und die Säule durch eine abschließende Zentrifugation für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit von Resten des Waschpuffers befreit. Die Elution der RNA aus der Silikamembran erfolgte mit 50 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) oder DEPC-Wasser mittels Zentrifugation bei 14.000 Upm. Zur Erhöhung der Ausbeute konnte die Säule für 10 min bei 60 °C vor dem Zentrifugationsschritt inkubiert werden. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

Die Menge und Reinheit der gewonnenen RNA wurde anhand der Extinktion [E] einer 1:100 verdünnten Lösung bei 230 nm, 260 nm und 280 nm in einem Photometer (GeneQuantII, Pharmacia Biotech) automatisch ermittelt.

Die Berechnung basiert auf folgender Formel:

$$\frac{E_{260} * 40 * \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} = \frac{\text{mg RNA}}{\text{ml}} \quad [\text{Gleichung 8}]$$

Die Quotienten $\left[\frac{E_{260}}{E_{230}} \right]$ und $\left[\frac{E_{260}}{E_{280}} \right]$ geben Auskunft über das Maß möglicher Verunreinigungen mit Polysacchariden bzw. Proteinen. Ein Wert von 1,8 – 2,0 gilt als Kriterium für eine ausreichend saubere RNA-Präparation.

2.2.2 ISOLIERUNG VON POLY(A)⁺-RNA

Die selektive Präparation von polyadenylierter RNA erfolgte durch Bindung an Thymidin-Oligomere (30-mer), welche entweder kovalent an Zellulose- (Oligo(dT)-Zellulose, Boehringer-Mannheim), oder an Eisenpartikel (Dynabeads Oligo(dT)₂₅) gebunden vorlagen.

2.2.2.1 ISOLATION MIT OLIGO(DT)-ZELLULOSE

(Otto, B. *et al.*, 1988 modifiziert nach Logemann *et al.*, 1987)

Im Standardansatz wurden zunächst 5 g Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff fein gemörsert und in einem vorbereiteten GSA-Zentrifugenbecher mit 50 ml Aufschlußpuffer (s.u.) und 100 µl Proteinase K-Lösung (Boehringer-Mannheim) überführt und für 30 min gut durchmischt (Überkopf-Schüttler). Nach Abtrennung der nicht löslichen Bestandteile durch Zentrifugation für 20 min bei Raumtemperatur und 10.000 Upm (Sorvall RC 5B) wurde der klare Überstand vorsichtig in einen frischen GSA-Zentrifugenbecher überführt und mit 0,1 Volumen 4 M NaCl und ca. 50 mg Oligo(dT)-Zellulose (resuspendiert in Bindungspuffer, s.u.) je g Pflanzenmaterial versetzt. Während der anschließenden Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz vorsichtig 30 min über Kopf geschüttelt. Die Oligo(dT)-Zellulose mit der gebundenen Poly(A)⁺-RNA wurde durch Zentrifugieren bei maximal 2500 Upm für 15 s sedimentiert und dreimal mit 20 – 30 ml Bindungspuffer gewaschen. Die Eluierung der Poly(A)⁺-RNA erfolgte durch Zugabe von 7 ml Elutionspuffer (s.u.) bei 60 °C. Anschließend wurden 6 ml des Überstandes in einen SS34-Zentrifugenbecher überführt und die Poly(A)⁺-RNA durch Zugabe von 0,2 Volumen 4 M NaCl und 2,5 Volumen 98 % Ethanol bei –20 °C über Nacht präzipitiert. Das durch Zentrifugation (20 min bei 12.000 Upm, Sorvall RC 5B) erhaltene Sediment wurde in 5 ml 70 % Ethanol-Na-Acetat (s.u.) gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die RNA wurde in einem passenden Volumen

RNase-freiem Wasser gelöst und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Mengenbestimmung erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben. Für die Regeneration der verwendeten Oligo(dT)-Zellulose wurde diese 10 min mit 0,1 N NaOH behandelt. Danach wurde sie solange mit Bindungspuffer gewaschen, bis dessen pH-Wert 7,5 betrug. Die Oligo(dT)-Zellulose wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

<u>Aufschlußpuffer:</u>	50 mM Tris-HCl; pH 7,5 0,1 M NaCl 2 % SDS
<u>Bindungspuffer:</u>	20 mM Tris-HCl; pH 7,5 0,4 M NaCl 0,5 mM EDTA 0,1 % SDS
<u>Elutionspuffer:</u>	10 mM Tris-HCl; pH 7,5
<u>Proteinase K-Lösung:</u>	100 mg/ml in 10 mM Tris-HCl; pH 7,5
<u>Ethanol-Na-Acetat:</u>	70 % Ethanol 30 % DEPC-Wasser 0,2 M Na-Acetat

2.2.2.2 ISOLATION MIT DYNABEADS OLIGO(DT)₂₅

(DynaL, Herstellerprotokoll)

Das vorliegende Protokoll dient der schnellen Isolation von Poly(A)⁺-mRNA aus Gesamt-RNA. Die mRNA wird dabei über Thymidin-Oligomere an Eisenpartikeln gebunden. Diese werden dann durch einen Magneten im Reaktionsgefäß während der nachfolgenden Waschschriffe bis zur Elution fixiert.

Zunächst wurden bis zu 75 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 100 µl bei 65 °C für 2 min denaturiert. Währenddessen wurde die Dynabeads Oligo(dT)₂₅-Suspension durchmischt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Nach Absetzen der Partikel wurde der Überstand entfernt und die Partikel mit 100 µl zweifach konzentriertem Bindungspuffer gewaschen. Vor Zugabe der aufbereiteten RNA-Lösung wurden die Partikel in 100 µl frischem Bindungspuffer resuspendiert. Die Anlagerung der mRNA an die Oligo(dT)₂₅-Partikel erfolgte durch vorsichtiges Umschwenken des Reaktionsgefäßes bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 5 min. Danach wurde das Gefäß in eine Magnethalterung (DynaL MPC) eingesetzt und nach 30 s der Überstand mit einer Pipette vorsichtig entfernt. Nach zweimaligem Waschen mit je 200 µl Waschpuffer wurde die mRNA durch Zugabe von 20 µl Elutionspuffer und einer Inkubation bei 65 °C für 2 min von den

Oligo(dT)₂₅-Partikel abgelöst. Mit Hilfe des Magnethalters wurden die Eisenpartikel an der Wand des Reaktionsgefäßes fixiert und die mRNA-Lösung in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.2.3 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON RNA

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA ermöglicht die qualitative Beurteilung der RNA hinsichtlich einer möglichen Degradation. Nach der am Photometer bestimmten Konzentration wurden je Probe 5 – 10 µg Gesamt-RNA in einem identischen Volumen RNA-Ladungspuffer aufgenommen und 10 min bei 65 °C denaturiert. Danach wurden die Proben für 2 min auf Eis inkubiert. Die Auftrennung erfolgte im denaturierenden 1% MEN-Agarosegel (s.u.) mit 1 * MEN-Puffer (s.u.). Nach dem Erstarren des Gels wurden die Proben bei konstanter Spannung von 80 V aufgetrennt. Als Größenstandard dienten RNA-Fragmente definierter Länge (RNA-Marker 0,5 - 9,0 kb; NEB). Das Trennungsmuster wurde unter UV-Licht durch die Fluoreszenz des gebundenen Ethidiumbromids sichtbar gemacht und dokumentiert (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech).

<u>RNA-Ladungspuffer:</u>	0,72 ml Formamid 0,16 ml 10 * MEN 0,26 ml 37 % Formaldehyd 0,18 ml bidest. Wasser 0,10 ml 80 % Glycerin 0,08 ml 2 % Bromphenolblau-Lösung 3 µl 1 % Ethidiumbromid-Lösung
<u>MEN-Agarosegel:</u>	0,5 g Agarose (ICN) 5 ml 10 * MEN 42,5 ml bidest. Wasser in der Mikrowelle lösen 2,7 ml 37 % Formaldehyd
<u>10 * MEN-Puffer:</u>	0,2 M Morpholinopropansulfonsäure 0,01 M EDTA 0,05 M Natriumacetat

beruhten auf einer alkalischen Lyse der *E. coli* Zellen und der selektiven Sedimentierung der bakteriellen, genomischen DNA, welche an der Zellmembran anhaftet. Die Plasmid-DNA verblieb dabei im Überstand. Ausgangsmaterial waren 3 ml einer Bakterienkultur in LB-Nährmedium. Die Kultur wurde bei 37 °C über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 150 - 200 Upm angezogen.

<u>LB-Nährmedium (1l):</u>	10,0 g NaCl
	5,0 g Hefeextrakt
	10,0 g Trypton
	auf pH 7,5 einstellen
	50 µg/ml Ampicillin nach dem Autoklavieren zugeben

Die Bestimmung von Menge und Reinheit der DNA erfolgte photometrisch wie unter 2.2.1.2 beschrieben. Die Berechnung erfolgte durch folgende Formel:

$$\frac{E_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} = \frac{\text{mg DNA}}{\text{ml}} \quad [\text{Gleichung 9}]$$

Die DNA-Lösung wurde bei 4 °C bzw. bei -20 °C dauerhaft aufbewahrt.

2.3.1.1 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA (SCHNELLE METHODE)

Dazu wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 sec in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet in 300 µl Puffer P1 vollständig resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte bei Raumtemperatur durch Zugabe von 300 µl Puffer P2. Nach einer maximalen Inkubation von 5 min wurde die genomische DNA durch Zugabe von 300 µl P3 in einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt selektiv gefällt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 600 µl Isopropanol versetzt und gut durchmischt. Der Ansatz wurde anschließend für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und das DNA-Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Abschließend wurde die DNA in 50 µl bidest. Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

<u>Puffer P1 (4 °C):</u>	100 µg / ml RNase A
	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM EDTA
<u>Puffer P2:</u>	200 mM NaOH
	1% SDS
<u>Puffer P3:</u>	3,0 M Kalium-Acetat, pH 5,5

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA

2.3.1.2 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA (SÄULENMETHODE)

Für diese Methode wurde zusätzlich ein Säulensystem der Firma QIAGEN verwendet. Je nach Größe der Kultur wurden QIAGEN-tip20 für maximal 5 ml Kultur, bzw. QIAGEN-tip100 für bis zu 50 ml Kultur verwendet. Die Lyse der Bakterien und anschließende Gewinnung des plasmidhaltigen Überstandes wurde wie unter 2.3.1.1 durchgeführt. Die verwendeten Mengen an Puffer wurden nach den Angaben des Herstellers an die jeweils eingesetzte Kulturgröße angepaßt. Vor dem Auftragen des klaren, plasmidhaltigen Überstandes auf die jeweils verwendete Säule, wurde diese mit Puffer QBT äquilibriert. Die an die Säulenmatrix gebundene Plasmid-DNA wurde anschließend zweimal mit Puffer QC gewaschen und danach mit Puffer QF eluiert. Das Eluat wurde dann mit 0,7 Volumen an Isopropanol versetzt und die DNA durch 30-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 15.000 * g sedimentiert. Das Pellet wurde mit 0,5 ml 70 % Ethanol (-20 °C) gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde dann in einem geeigneten Volumen an bidest. Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

Puffer QBT: 750 mM NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % Ethanol
0,15 % Triton X-100

Puffer QC: 1,0 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % Ethanol

Puffer QF: 1,25 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % Ethanol

2.3.2 SPALTUNG VON PLASMID-DNA DURCH RESTRIKTIONS- ENDONUKLEASEN

Zur Charakterisierung bzw. zum gezielten Abbau von Plasmid-DNA wurden spezifisch spaltende Restriktionsenzyme verwendet. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den jeweiligen Vorschriften der Hersteller (Gibco BRL, MBI Fermentas). Um einen vollständigen Abbau der DNA zu erreichen, wurden 2 Einheiten (U) eines Enzyms pro µg DNA eingesetzt und der Ansatz 1 h bei 37 °C in einem Heizblock inkubiert. Bei kritischen Reaktionen war es notwendig eine Kondensation durch inhomogene Temperaturverteilung im Reaktionsgefäß auszuschließen. Hierzu wurde der Ansatz in

einem geschlossenen Brutschrank inkubiert und so konstante Bedingungen gewährleistet. Das Reaktionsvolumen wurde entsprechend der eingesetzten Menge an DNA und Enzym variiert, betrug aber mindestens 50 µl, um eine ausreichende Verdünnung des Enzym-Lagerungspuffers zu erreichen. Die Reaktion wurde entweder durch Zugabe von wenigstens $\frac{1}{6}$ Volumen Stopp-Puffer (s.u.), oder Erhitzen auf 75 °C für 10 min abgestoppt. Letzterem folgte eine Fällung mit 0,1 Volumen Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 98 % Ethanol (-20 °C) bei -80 °C für 30 min. Nach Zentrifugation (13.000 Upm) wurden dem Sediment durch Waschen mit 70 % Ethanol (-20 °C) die Salze entzogen. Anschließend wurde das luftgetrocknete DNA-Pellet in einem geeigneten Volumen bidest. Wasser oder TE-Puffer gelöst und bei -20 °C dauerhaft gelagert, bzw. bei 4 °C aufbewahrt. Zur Überprüfung der Reaktion folgte eine elektrophoretische Auftrennung (siehe 2.3.3).

<u>Stopp-Puffer:</u>	50 % Glycerin
	7,5 mM EDTA
	0,4 % Xylenxyanol
	0,4% Bromphenolblau

2.3.3 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Die größenabhängige Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese im Agarosegel (ICN). Die Konzentration der Agarose richtete sich dabei nach der zu erwartenden Fragmentgröße und lag zumeist bei 1 %. Als Puffer diente 1 * TAE-Puffer (s.u.). Zur Auftrennung wurde eine Spannung zwischen 5 - 10 Volt/cm gewählt. Als Größenstandard dienten DNA-Fragmente definierter Länge (1 kb DNA-Leiter & 50bp DNA-Leiter; Gibco BRL). Die Sichtung und Dokumentation der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht (ImageMaster, Pharmacia Biotech) durch die Fluoreszenz des gebundenen Ethidiumbromids, welches zuvor der verflüssigten Agarose zugesetzt wurde (0,05 µg/ml).

<u>50 * TAE-Puffer (1l):</u>	242 g Tris, pH 8,0
	57,1 ml Essigsäure (99 %)
	100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

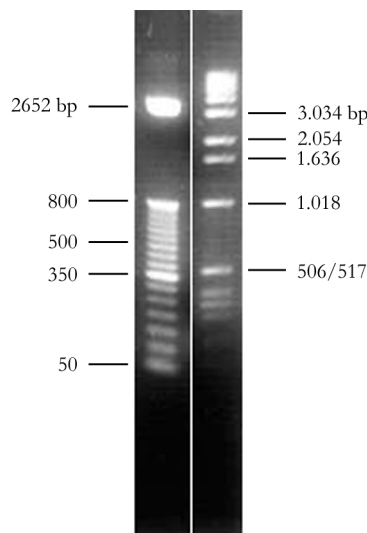


Abbildung 2-2: Verwendete Größenstandards. Links: 50 bp DNA-Leiter. Rechts: 1 kb DNA-Leiter. Die Längen ausgewählter DNA-Fragmente ist angegeben.

2.3.4 ELUTION VON DNA AUS DEM AGAROSEGEL

Eine mit Ethidiumbromid angefärbte DNA-Bande wurde nach Auftrennung im Agarosegel (siehe 2.3.3) unter UV-Licht (Transilluminator, 302 nm) gesichtet und zusammen mit der umgebenen Agarose ausgeschnitten. Der Agaroseblock wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit dem QIAEXII-System (QIAGEN, Hilden) unter Verwendung der mitgelieferten Pufferlösungen anhand des Herstellerprotokolls. Die Agarose wurde während einer 10-minütigen Inkubation bei 50 °C in einem dreifachen Volumen Puffer QX1 aufgelöst und die DNA in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration an spezielle Partikel (QIAEX-Suspension) gebunden. Es folgten mehrere Zentrifugations- und Waschschrte, zuerst mit 500 µl Puffer QX1, dann mit 500 µl Puffer PE. Dabei wurde die Salzkonzentration in den Pufferlösungen kontinuierlich verringert. Abschließend wurde das Partikelsediment an der Luft vollständig getrocknet und die DNA durch Zugabe von 20 µl TE-Puffer (siehe 2.3.1.1) von den Partikeln eluiert. Die Ausbeute konnte dabei durch eine Inkubation für 5 min bei 50 °C erhöht werden. Nach einer abschließenden Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit konnten etwa 15 µl DNA-haltige Lösung vorsichtig abgenommen werden. Zur Kontrolle wurde eine Aliquot erneut im Agarosegel aufgetrennt.

2.3.5 TRANSFERVERFAHREN FÜR DNA („SOUTHERN-BLOT“)

Zunächst wurden DNA-Fragmente in einem TAE-Agarosegel aufgetrennt (s.2.3.3). Es folgte zweimal für je 30 min eine Behandlung des Gels mit Denaturierungspuffer (s.u.). Anschließend wurde das Gel zweimal für je 20 min in Neutralisationspuffer (s.u.) geschwenkt und dann luftblasenfrei mit der Oberseite auf ein Filterpapier (Whatman, 3MM) gelegt. Dieses hatte Kontakt mit einem Pufferreservoir aus 10 * SSC-Puffer (s. 2.2.4). Die für den Transfer verwendete Nylonmembran wurde für 15 min in diesem Puffer äquilibriert und auf das Gel luftblasenfrei

aufgebracht. Die weitere Durchführung und Aufbau des Kapillarblots entsprachen denen in Kapitel 2.2.4. Die transferierte DNA wurde anschließend durch UV-Bestrahlung fixiert.

<u>Denaturierungspuffer:</u>	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
<u>Neutralisationspuffer:</u>	1,0 M Tris-HCl; pH 8,0 1,5 M NaCl

2.4 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA

2.4.1 „RANDOM PRIMING“ MIT OLIGONUKLEOTIDEN

Die Methode basiert auf einem von Feinberg und Vogelstein (1983, 1984) entwickelten Verfahren. Hierbei werden Oligonukleotide, in denen Nukleotidsequenzen praktisch aller statistisch möglichen Anordnungen vertreten sind, als Primer für eine DNA-Polymerase („Klenow-Fragment“) verwendet. Zur Durchführung wurde das „ready-to-go“ DNA Labelling System der Firma Pharmacia Biotech entsprechend den Angaben im Herstellerprotokoll eingesetzt. Das System erlaubt die radioaktive Markierung von geringen Mengen an DNA (25 - 50 ng) mit einer hohen spezifischen Aktivität von bis zu $1 \cdot 10^9$ cpm/ μ g DNA. Dazu wurde ein lyophilisiertes Sediment aus dATP, dGTP, dTTP, FLP Cpure Klenow-Fragment, Reaktionspuffer und Zufallsprimern (Nonadesoxynukleotide) in einem Reaktionsgefäß mit bidest. Wasser gelöst und auf Eis gestellt. Anschließend wurde das als Sonde zu markierende DNA-Fragment für 2 bis 3 min bei 95 °C denaturiert. Der endgültige Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

<u>Reaktionsansatz:</u>	20 μ l gelöster Reaktionsmix 25 μ l denaturierte DNA (25 - 50 ng) 5 μ l [32 -P]dCTP (3.000 Ci/mmol)
-------------------------	---

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Chromatographie an einer Säule aus Sephadex G50 in TE-Puffer abgetrennt. Dazu wurde die Säule für 3 min bei 3.000 Upm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde mit TE-Puffer auf 100 μ l aufgefüllt. und 1 μ l zur Messung der eingebauten Radioaktivität mittels Szintilationszähler eingesetzt. Nach Denaturierung für 5 min bei 95 °C stand die markierte DNA als Sonde für eine Hybridisierung zur Verfügung, oder konnte bei -20 °C gelagert werden.

2.4.2 SYNTHESE EINER SPEZIFISCHEN EINZELSTRANG-SONDE

(verändert nach Stürzl und Roth, 1990)

Eine spezifische Einzelstrangsonde geht als Produkt aus einer linearen PCR-Reaktion hervor bei der jeweils nur ein genspezifischer Primer eingesetzt wurde. Dazu wurde der rekombinante Vektor, welcher die zu markierende cDNA-Insertion enthielt mittels geeigneter Restriktionsendonukleasen verdaut und der Ansatz im TAE-Agarosegel aufgetrennt. Das DNA-Fragment wurde aus dem Gel eluiert (s. 2.3.4) und stand anschließend als Matrize für die lineare PCR-Reaktion zur Verfügung.

<u>PCR-Ansatz (100 µl):</u>	100 - 200 pmol genspezifischer Primer
	10 µl 10 * <i>Taq</i> -Reaktionspuffer
	50 mM MgCl ₂
	200 µM dATP, dGTP, dTTP
	6,25 µM dCTP
	50 µCi [- ³² P]dCTP (3.000 Ci/mmol)
	2,5 U <i>Taq</i> -DNA Polymerase (AGS, Biotherm)
	10 ⁹ - 10 ¹⁰ Moleküle Matrizen-DNA

Als Thermocycler wurde ein Gerät der Firma Hybaid verwendet, das mit einer Deckelheizung ausgestattet war. Dadurch entfiel das Übersichten des Ansatzes mit Mineralöl. Die PCR-Reaktion wurde dann mit folgenden Parametern durchgeführt, wobei T_A für die optimale Anlagerungs („Annealing“)-Temperatur des genspezifischen Primers steht:

Denaturierung	Anlagerung des Primers	Extension	
94 °C / 3 min			1 Zyklus
94 °C / 30 s	T _A / 30 s	72 °C / 45 s	50 Zyklen

Nach 50 Zyklen wurden nicht eingebaute Nukleotide mittels einer Sephadex G50-Säule abgetrennt (s. 2.4.1). Ein parallel durchgeführter PCR-Ansatz ohne [-³²P]dCTP diente als Kontrolle und wurde im TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die weitere Aufarbeitung der Sonde erfolgte wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben.

2.5 HYBRIDISIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

Die Nylonmembran mit der daran gebundenen RNA oder DNA wurde zunächst mit bidest. Wasser gespült, um sie von Salzurückständen des Transferpuffers zu befreien. Anschließend wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre gelegt und mit ca. 10 ml Hybridisierungslösung (Roth) für 30 min bei 68 °C und kontinuierlicher Rotation in einen Hybridisierungsinkubator (Biometra) vorhybridisiert. Nach Zugabe der ³²P-markierten Sonde (s. 2.4) erfolgte die eigentliche

Hybridisierung bei 68 °C über Nacht. Anschließend wurde die Membran nach folgendem Protokoll gewaschen, um unspezifische DNA/DNA-, bzw. DNA/RNA-Hybride zu trennen:

Standard-Waschprotokoll: 30 min Hybridisierungslösung
30 min 1 * SSC-Puffer
90 min 0,1 * SSC-Puffer
30 min 0,1 * SSC-Puffer
Alle Waschschrirte wurden bei 68 °C und leichtem Schwenken im Wasserbad durchgeführt.

Im Anschluß wurde die Membran mit bidest. Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Fixiert auf einem vorbereiteten Stück Filterpapier (Whatman, 3MM) wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und für die Exposition eines Röntgenfilmes (Kodak, X-OMAT AR, 13 * 18 cm) eingesetzt. Die Exposition erfolgte bei -80 °C in einer lichtdichten Kassette mindestens über Nacht. Zur Entwicklung des belichteten Röntgenfilms wurden spezielle Entwicklungs- und Fixierlösungen (TETENAL) verwendet.

Die Membran konnte bei 4 °C gelagert oder für eine erneute Hybridisierung mit einer anderen Sonde genutzt werden. Hierfür musste zunächst die gebundene Radioaktivität in zwei Waschschrirten für je 15 min von der Membran entfernt werden.

Waschprotokoll: 0,1 * SSC
0,1 % SDS
2 * 15 min bei 100 °C

2.6 POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR)

Zum Nachweis, bzw. der Klonierung von DNA-Abschnitten wurden diese mittels PCR-Reaktion exponentiell vermehrt. Zur qualitativen und quantitativen Kontrolle wurde ein Aliquot der Reaktion in einem TAE-Agarosegel aufgetrennt.

2.6.1 KONSTRUKTION DER PRIMER

Die Sequenzen und Eigenschaften geeigneter Primer, sowie die Parameter zur Durchführung der PCR-Reaktion wurden am Computer unter Anwendung der Software Oligo 5.0 (National Biosciences) ermittelt. Besonders berücksichtigt wurde dabei der GC-Gehalt der Primer, die thermische Stabilität von Sekundärstrukturen, die Genspezifität, sowie eine möglichst hohe optimale Anlagerungstemperatur ($T_A = T_M - 5$ °C). Primer mit angefügten Restriktionsschnittstellen wurden um mindestens 5 zusätzliche, beliebige Nukleotide im 3'-Bereich verlängert. Die Primer wurden von der Firma MWG bezogen.

2.6.2 PCR STANDARDEXPERIMENT

Bei Raumtemperatur wurden folgende Komponenten in einem 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß zusammengestellt.

<u>Standardansatz (20μl):</u>	1 - 10 ng DNA-Matrize
	10 pmol „sense“ Primer (+Strang)
	10 pmol „antisense“ Primer (- Strang)
	1 * Taq-Reaktionspuffer
	2,5 mM MgCl ₂
	0,2 mM dNTP-Mix (Eurogentech)
	2 U Taq-DNA Polymerase (Biotherm)

Der Ansatz wurde mit wenigen Tropfen Mineralöl (Sigma) überschichtet. Als Negativkontrolle diente ein identischer Ansatz ohne DNA. Nach den Vorgaben der Software Oligo 5.0 wurden die Parameter zur Programmierung des verwendeten Thermocyclers festgelegt. Standardmäßig wurden dabei 3 verschiedene Programmabschnitte definiert. Der erste Abschnitt sah eine Vordenaturierung der DNA bei 94 °C für 1 bis 3 min vor. Danach folgten mit 30 bis 40 Wiederholungen Denaturierung, Anlagerung der Primer an die Zielsequenzen und die Verlängerung der Primer durch die Aktivität der *Taq*-DNA Polymerase. Die Reaktion wurde durch einen 5 bis 10 min Syntheschritt abgeschlossen. Dieser Schritt bewirkte die vollständige Verlängerung aller Abbruchfragmente und war vor allem für die Klonierung des PCR-Produktes mittels TA-Klonierung (s. 2.7) notwendig. Für die Durchführung standen Thermocycler der Firmen Landgraf, Stratagene (RoboCycler Gradient 40) und Hybaid zur Verfügung.

Denaturierung	Anlagerung	Extension	
94 °C / 1 - 3 min			1 Zyklus
94 °C / 30 s	T _A / 30 s	72 °C / 45 s	30 - 40 Zyklen
		72 °C / 5 - 10 min	1 Zyklus

2.7 KLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN

2.7.1 TA-KLONIERUNG VON PCR-PRODUKTEN

Der Vektor pCR 2.1 TOPO ist Bestandteil des Klonierungssystems „TA TOPO Cloning Kit“ der Firma Invitrogen. Dieses System wurde speziell zur schnellen Subklonierung der durch *Taq* DNA-Polymerase exponentiell amplifizierten DNA-Spezies konstruiert. Dieses Enzym besitzt eine matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität mit einer hohen Präferenz für dATP. Dadurch weisen die meisten 3'-Enden der PCR-Produkte ein überhängendes Adenin auf. Der linearisierte vorliegende Vektor weist komplementär dazu ein überhängendes dTTP auf, welches die Effizienz der Ligation von PCR-Produkten deutlich erhöht. An die freien Enden des Vektors ist eine

Topoisomerase konjugiert, welche die Durchführung der Ligation bei Raumtemperatur innerhalb von nur 5 Minuten erlaubt. Dazu wurde der Ansatz entsprechend den Angaben des Herstellers unmittelbar nach Beendigung der PCR-Reaktion zusammengestellt und 1 µl nach Abstoppen der Ligation für die anschließende Transformation eingesetzt (siehe 2.7.3). Die folgende Skizze erläutert das Prinzip der TOPO TA-Klonierung (siehe Abbildung 2-3):



Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Polylinker-Region des Vektors pCR 2.1 TOPO zur Veranschaulichung des Klonierungsprinzips. Gelb dargestellt ist die Topoisomerase.

Die Polylinker-Region des Vektors pCR 2.1 TOPO (siehe Abbildung 2-4) weist unterschiedliche Restriktionsschnittstellen auf und besitzt den Promotorabschnitt für die T7 RNA-Polymerase. Nach erfolgter Klonierung können beide DNA-Stränge der Insertion durch Nutzung der 4 flankierenden Primer sequenziert werden (siehe 2.3.6.). Weiterhin codiert der Vektor für die Resistenzgene gegen die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin und bietet die Möglichkeit der blau/weiß-Selektion. Mit einem rekombinanten Plasmid transformierte Bakterien bilden weiße Kolonien auf LB-Agarplatten, da hier das β -Galaktosidasegen durch die Insertion unterbrochen ist. Blaue Kolonien deuten auf nicht rekombinante Plasmide hin, da hier eine funktionelle β -Galaktosidase den Farbstoff X-Gal im Medium zu einem blauen Farbstoff umsetzt.

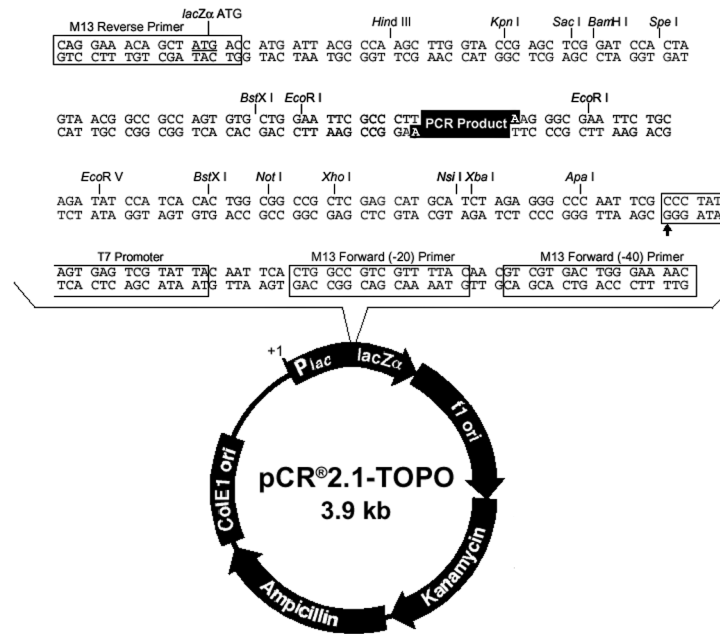


Abbildung 2-4: Aufbau des Vektors pCR® 2.1-TOPO. Vermerkt sind die Bereiche der beiden Resistenzgene, das Lactose Operon (P_{lac} und $lacZ$), der Startpunkt für die Infektion mit einem Helferphagen ($f1\ ori$), sowie der Replikationsstartpunkt für das Plasmid ($ColE1\ ori$). Ebenfalls angegeben ist die Sequenz des Polylinkers mit den Positionen der Primer „M13 Reverse“, „M13-(20 und 40) Forward“ und die des T7-Promotors angegeben. Restriktionsschnittstellen und der Bereich für die Insertion des PCR-Produktes sind gekennzeichnet.

2.7.2 STANDARDVERFAHREN ZUR KLONIERUNG VON cDNA-FRAGMENTEN IN PLASMID-DNA

Bei einer Ligationsreaktion beeinflusst das molare Verhältnis von linearisiertem Vektor zu cDNA die Ausbeute an nützlichen Rekombinanten. In Konkurrenz stehende Ligationsreaktionen sind die Re-Ligation des Vektors, bzw. die Bildung von cDNA-Concatemeren. Beides wird durch ein Mißverhältnis von Vektor zu cDNA gefördert. Der Hersteller des Ligationssystem (MBI Fermentas) empfiehlt für eine optimale Ligation ein Verhältnis von 1:1 bis 3:1 (cDNA zu Vektor). Die Berechnung der benötigten Menge an modifizierter cDNA in Relation zur eingesetzten Menge an linearisiertem Vektor erfolgte nach folgender Formel:

$$x \text{ ng cDNA} = \frac{V * (\text{Länge cDNA} [\text{bp}] / \text{Länge Vektor} [\text{bp}])}{\text{Länge Vektor} [\text{bp}]} \quad [\text{Gleichung 10}]$$

V = Verhältnis cDNA zu Vektor

Für die Ligation wurden Komponenten der Firma MBI Fermentas verwendet. Die Zusammenstellung des Reaktionsansatzes wurde entsprechend den Angaben des Herstellers vorgenommen.

Ligationsansatz:

2 µl	10 * Ligationspuffer (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 5 mM ATP; pH 7,8)
x µl	cDNA
1 µl	50 ng modifizierter Vektor
4 µl	50% PEG 4000 nur bei „blunt-end“ Ligation mit bidest. Wasser auf 20 µl auffüllen
4 µl	T4 DNA Ligase (1 Weiss U/µl)

Der Ansatz wurde kurz durchmischt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die T4 DNA-Ligase wurde anschließend für 5 min bei 75 °C inaktiviert und maximal 5 µl des Ansatzes für die nachfolgende Transformation eingesetzt.

2.7.3 TRANSFORMATION

Als Bakterienstamm für die Klonierung diente der *E. coli* Stamm TOP10F', welcher als kompetente Zellen (One Shot) mit dem TOPO TA-Klonierungssystem (Invitrogen) zur Verfügung gestellt wurde. Der Bakterienstamm hat folgenden Genotyp: F' *lacI*^q Tn10 (Tet^R) *mcrA* (*mrr-bsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ* M15 *lacX74* *recA1* *araD139* (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*.

Die Transformation kompetenter „One Shot“ Zellen erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers Invitrogen. Dazu wurden 1 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl einer Suspension von kompetenten Zellen vermischt und für 30 Min im Eisbad inkubiert. Dann wurden die Bakterien einem Hitzeschock (42 °C für 30 Sek) ausgesetzt. Nach erneuter Abkühlung im Eisbad wurde die Suspension mit 450 µl SOC-Medium bei 37 °C für 1 h mit 225 Upm geschüttelt. Proben wurden dann auf LB-haltigem Agar-Nährboden, welcher Ampicillin (50 µg/ml), IPTG (60µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml) enthielt, ausgestrichen. Die Bakterien wuchsen über Nacht bei 37 °C. Transformanden wurden durch die Ampicillin-Resistenz und die weiße Färbung ihrer Kolonien selektiert.

<u>SOC-Medium (pH 7,0):</u>	2 % Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	10,0 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10,0 mM MgSO ₄
	20,0 mM Glucose

<u>LB-Nähragar (1l; pH 7,0):</u>	10 g NaCl
	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	15 g Agar

Von den weißen Kolonien wurden DNA-Minipräparationen hergestellt. Zur Gewinnung der möglichen Insertion wurden 1 µg Plasmid-DNA eines jeden Klons mit geeigneten Restriktionsendonukleasen bei 37 °C für 1 h abgebaut (siehe 2.3.2). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (siehe 2.3.3) erfolgte die Größenbestimmung mit der 1 kb DNA-Leiter (Gibco BRL) als Größenstandard.

2.8 SEQUENZIERUNG

Bei allen verwendeten Vektoren wird die Polylinker-Region von spezifischen Primern flankiert, welche Sequenzreaktionen an beiden Strängen der inklonierten DNA-Insertion erlaubt. Dabei wurden für die Vektoren pCR 2.1 bzw. pGemHE folgende Primer verwendet:

<u>M13 Reverse Primer:</u>	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
<u>T7-Primer:</u>	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
<u>M13 (-21) Primer:</u>	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

Da der Vektor pGemHE in der 3' UTR über eine sehr lange adeninreiche Sequenz verfügt, war es notwendig einen Sequenzprimer zu wählen, der in 3'-Richtung näher zur DNA Insertion positioniert war.

<u>SEQ 800:</u>	5'-GGTAATATGCTTAGAGACTCCA-3'
-----------------	------------------------------

Zum Einsatz kamen Sequenzprimer der Firma MWG, welche über eine fluorochrome Gruppe am 5'-Ende markiert waren (Modifikation 5' IRD 800). Die Sequenzreaktion wurde nach dem Protokoll des „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ der Firma AMERSHAM durchgeführt. Dazu wurden in einen Reaktionsgefäß ein Primermix mit dem zu verwendenden Sequenzprimer folgendermaßen angesetzt:

<u>Primermix:</u>	2 µg DNA
	1 µl Sequenzprimer (1pmol/µl)
	0,5 µl DMSO
	ad 13 µl H ₂ O

In einer PCR-Mikrotiterplatte wurden anschließend je 1 µl des Terminationsmix A,C,G, bzw. T vorgelegt und 3 µl von dem Primermix dazugegeben. Jeder Terminationsmix bestand dabei aus folgenden Komponenten:

Terminationsmix: Tris-HCl (pH 9,5), MgCl₂, Tween 20, Nonidet P-40, 2-mercaptoethanol, dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP, thermostabile Pyrophosphatase und Thermo Sequenase DNA Polymerase

Zusätzlich war in jedem Terminationsmix jeweils ein Didesoxynukleotid (z.B. Terminationsmix A; ddATP) vorhanden, das zu einem Abbruch der Synthese und somit zu einer statistischen Verteilung aller möglichen Fragmentlängen führte. Die PCR-Mikrotiterplatte wurden in einem Thermocycler (Primus) mit folgenden Programmparametern durchgeführt:

95°C / 30 s			1 Zyklus
95°C / 10 s	54°C / 30 s	65°C / 30 s	15 Zyklen
95°C / 30 s		70°C / 30 s	15 Zyklen

Nach Beendigung der PCR wurde den Ansätzen Ladungspuffer zugegeben.

Ladungspuffer: Formamid, EDTA, Methylviolett

Das Auftrennen der Sequenzreaktionen erfolgte in einem Acrylamidgel unter gleichzeitiger Detektion der Fluoreszenz im LI-COR DNA Analyzer Gene Reader 4200.

Acrylamidgel: 12,6 g Harnstoff
3 ml Acrylamid (40 %)
3 ml 10xTBE
mit H₂O auf 33,8 ml auffüllen, lösen, filtrieren
50 µl 40 % APS (Ammoniumpersulfat)
20 µl TEMED

10 x TBE-Puffer (1l): 108 g Tris, pH 8,0
55 g Borsäure
40 ml 0,5 M EDTA-Lösung

Die Auswertung der aufgetrennten Sequenzierungsreaktionen erfolgte mit der Software des Herstellers LI-COR (Base Imagir 4.0). Die resultierenden DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm DNasis (Hitachi) analysiert. Homologien der Sequenzen wurden mit dem Blast-

Algorithmus (Altschult *et al.* 1990) von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ermittelt. Vergleiche auf Nukleotidebene wurden mit der Computersoftware Clustal X 1.5b erstellt und mit Macboxshade 2.15 grafisch dargestellt.

2.9 HERSTELLEN EINER CDNA-BIBLIOTHEK

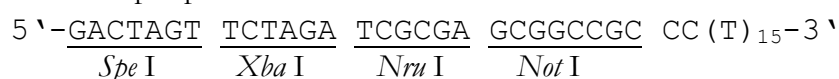
Verwendet wurde das SuperScript™ Lambda System der Firma Gibco BRL. Es bietet den Vorteil, dass Erst- und Zweitstrangsynthese nacheinander in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Dadurch wird die Anzahl an möglichen Fehlerquellen minimiert und die Ausbeute an cDNA erhöht. Das Endprodukt ist eine cDNA-Population, welche in definierter Orientierung in Phagenarmen des -Phagen (ZipLox) vorliegt. Es wurde entsprechend den Angaben im Herstellerprotokoll vorgegangen.

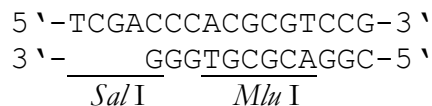
2.9.1 SYNTHESE VON CDNA

Für die Erststrangsynthese wurden 3 µg mRNA von *Nicotiana tabacum* eingesetzt. Nach Anlagerung des *Not* I-Adapterprimers (s.u.) an den polyadenylierten 3'-Terminus erfolgte die Umschrift der mRNA in einen komplementären cDNA-Einzelstrang mittels reverser Transkriptase (SuperScript RT). Anschließend wurde der mRNA-Strang des gebildeten DNA/RNA-Hybrids mittels RNase H partiell verdaut. Die verbleibenden mRNA Fragmente im Hybrid dienten in der folgenden Zweitstrangsynthese als Primer. Für die später vorgesehene säulenchromatographische Größenfraktionierung und Qualitätskontrolle der doppelsträngigen cDNA wurde die Synthese in Gegenwart von 1 µl [-³²P]dCTP (10 µCi/µl) durchgeführt. Nach Abschluß der Zweitstrangsynthese wurde ein Teil der Reaktion in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend mittels alkalischem Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert. Die Dokumentation erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilmes.

Im nächsten Arbeitsschritt wurde der 5'-Bereich der cDNA durch eine T4 DNA-Polymerase geglättet und anschließend der *Sal* I-Adapter angehängt. Nach einem Restriktionsverdau mit der Endonuklease *Not* I folgte die Größenfraktionierung der cDNA mittels Säulenchromatographie. Dabei wurden nicht eingebaute *Sal* I-Adapter, sowie niedermolekulare cDNA Fragmente (<500 bp) abgetrennt. Der Durchfluß wurde in 20 Fraktionen aufgeteilt und anschließend die Radioaktivität jeder einzelnen Fraktion im Szintillationszähler (Tri-Carb1900CA Packard Canberra, Cherenkov-Methode) bestimmt. Entsprechend den Angaben im Herstellerprotokoll wurden 3 Fraktionen ausgewählt und vereinigt.

Not I-Adapterprimer:



SalI-Adapter:**2.9.2 LIGATION DER cDNA MIT ZIPLOX**

Die cDNA wurde zunächst mit 2 Volumen 98% Ethanol bei -20 °C gefällt und anschließend mit 0,5 ml 70% Ethanol von Salzen befreit. Das an der Luft getrocknete Sediment wurde direkt für die folgende Ligrationsreaktion mit den *Not* I-/*Sal* I-Phagenarmen (s. Abbildung 2-5) eingesetzt. Der Ansatz wurde entsprechend den Angaben des Herstellers zusammengestellt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz für die *in vitro* Verpackung verwendet.

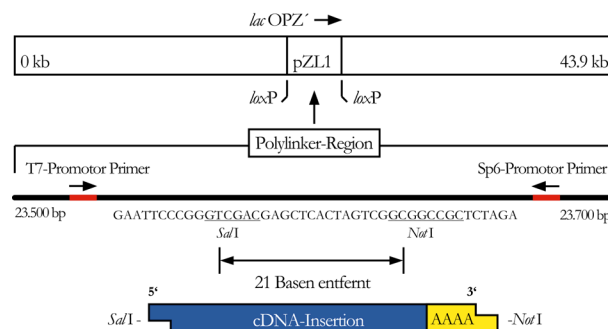


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des ZIPLOX Phagen unter Angabe der genutzten Restriktionsschnittstellen *Sal* I und *Not* I (unterstrichen), sowie der Position der cDNA-Insertionen. Die Position der T7- und Sp6-Promotor Primerbindungsstellen haben einen Abstand von 150 bp und sind durch rote Linien markiert.

2.9.3 IN VITRO VERPACKUNG UND INFEKTION VON ESCHERICHIA COLI

Zunächst wurden der Wirtstamm *E. coli* Y1090(ZL) angezogen. Dazu wurden 200 µl steriles SOC-Medium (s. 2.7.3) auf die vom Hersteller (Gibco BRL) mitgelieferte „BACTI Disk“ gegeben und der Ansatz für 10 min bei 37 °C inkubiert. Mit einer Impföse wurde ein Verdünnungsausstrich der Bakteriensuspension auf einer YT-Agarplatte (s.u.) angefertigt und diese dann über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde am nächsten Tag in 10ml YT-Flüssigmedium mit 0,2% (w/v) Maltose und 10 mM MgSO₄ überimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 180 Upm und 37 °C inkubiert. Dabei induzierte die Maltose im Nährmedium die Ausbildung von Maltoserezeptoren, an denen sich die Phagen bei der nachfolgenden Infektion anhefteten. Am dritten Tag wurden die Bakterien so lange inkubiert, bis die OD₆₀₀ etwa 1 betrug. Anschließend wurden die Bakterien bei 1.000 * g für 10 min zentrifugiert und das Sediment in 10 ml 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert. Die OD₆₀₀ wurde erneut gemessen und die Bakteriensuspension mit 10 mM MgSO₄-Lösung auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt.

Für die Verpackung der zuvor hergestellten rekombinanten Phagenarme wurde das Gold Gigapack (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurde der Verpackungsextrakt bei 37 °C aufgetaut und sofort die gesamte Ligationsreaktion (s. 2.9.2) zugegeben und durchmischt. Der Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur belassen. Die Verpackungsreaktion wurde dann durch Zugabe von 0,5 ml Phagensuspensionspuffer abgestoppt. Es folgte eine Extraktion mit 20 µl Chloroform und nach einem kurzem Zentrifugationsschritt bei max. Geschwindigkeit wurde der phagenhaltige Überstand abgenommen.

Für die Infektion des Wirtstammes wurden 200 µl der zuvor konditionierten Bakterien mit 50 µl Phagenlösung vermennt und der Ansatz für 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur exakten Bestimmung des Phagentiters wurden dabei 5 verschiedene Verdünnungen der Phagensuspension eingesetzt. Folgende Verdünnungsstufen wurden hergestellt:

Jeweils in 50 µl Phagensuspensionspuffer:

Ansatz 1	10 µl Phagenlösung	(1:5)
Ansatz 2	1 µl Phagenlösung	(1:50)
Ansatz 3	0,1 µl Phagenlösung	(1:500)
Ansatz 4	0,01 µl Phagenlösung	(1:5.000)
Ansatz 5	0,0001 µl Phagenlösung	(1:500.000)

Die 5 Ansätze wurden jeweils in 5ml noch flüssigen Top-Agar (maximal 48 °C; s.u.) gegeben, vorsichtig durchmischt und auf vorbereitete Petrischalen mit Bottom-Agar (s.u.) gegeben und zügig durch Umschwenken gleichmäßig verteilt. Nach dem Erstarren des Top-Agar wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Anzahl der entstandenen Phagenplaques für jede der Verdünnungsstufen ausgezählt.

<u>YT-Nährmedium (1l):</u>	16 g Trypton
	10 g Hefeextrakt
	5 g NaCl
	0,2 % Maltoselösung
	10 mM MgSO ₄

<u>YT-Nähragar:</u>	YT-Nährmedium ohne Maltose und MgSO ₄
	1,5% Agar

<u>Phagensuspensionspuffer:</u>	100 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM Tris pH 7,5

<u>Bottom-Agar:</u>	NZYM-Agar als Fertigkapseln (Dianova)
---------------------	---------------------------------------

<u>Top-Agar:</u>	1 % Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	1 % NaCl
	10 mM MgSO ₄
	0,75 % Agarose

Die Maltoselösung wurde als 20% Stocklösung angesetzt und sterilfiltriert. Die MgSO₄- und MgCl₂-Lösung wurden als 1 M Stocklösungen angesetzt und getrennt autoklaviert. Die 50 % Glucoselösung wurde ebenfalls getrennt autoklaviert.

2.9.4 BESTIMMEN DER INSERTIONSGRÖÖE MITTELS PCR

Um den prozentualen Anteil an rekombinanten Phagen und die durchschnittliche Insertionsgröße zu bestimmen, wurden 10 vereinzelte Plaques mit einer Pipettenspitze ausgestochen und in je 50 µl bidest. Wasser überführt. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert und im folgenden für eine PCR-Reaktion eingesetzt. Hierbei wurden die T7 und Sp6-Promoter Primer verwendet, welche die cDNA-Insertion flankieren. Bei nicht rekombinanten Phagen weisen die Bindungsstellen dieser Primer einen Abstand von 150 bp auf der Phagen-DNA auf. Die 10 Reaktionsansätze wurde entsprechend den Angaben in Kapitel 2.6.2 zusammengestellt und die Reaktion mit den dort angegebenen Parametern durchgeführt. Anschließend wurden Aliquots der PCR-Reaktionen in einem TAE-Agarosegel aufgetrennt (s. 2.3.3).

2.9.5 IDENTIFIZIERUNG VON AQUAPORINHOMOLOGEN SEQUENZEN

Zunächst wurden die Phagen (s. 2.9.3) amplifiziert und dabei auf 10 Pools verteilt. Dazu wurden je 50 µl der Phagensuspension mit je 1 ml der kompetenten Y1090ZL Bakterien bei 37 °C für 20 min inkubiert und anschließend in je 10 ml Top-Agar überführt und auf Bottom-Agar ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Phagen mit je 10 ml Phagensuspensionspuffer für 6 h unter leichtem Schwenken abgeschwemmt. Die Überstände wurden abgenommen und mit je 20 µl Chloroform extrahiert. Die Identifizierung von aquaporinhomologen Sequenzen erfolgte mittels PCR. Dazu wurden zwei Konsensus-Primer verwendet, die von den hochkonservierten Bereichen (NPA-Motive) des PIP1b-Gens aus *Arabidopsis thaliana* abgeleitet worden waren. Das zu erwartende Fragment sollte dabei eine Länge von ca. 400 bp aufweisen. Die Abbildung 2-6 verdeutlicht die Strategie:

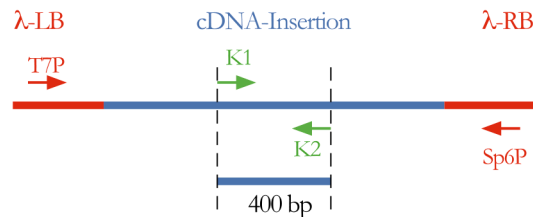


Abbildung 2-6: Dargestellt ist die rekombinante Phagen-DNA im Bereich der Polylinker-Region (vergleiche Abbildung 2-5). Vermerkt sind die relativen Positionen der Konsensus-Primer K1 und K2 (grün) auf der cDNA-Insertion (blau). Angrenzende Bereiche der Phagen-DNA, sowie die Position und Orientierung der Promotorprimer T7 und Sp6 sind rot dargestellt.

Für jeden der 10 Phagenpools wurde folgender PCR-Ansatz zusammengestellt:

PCR-Ansatz (50 µl):

- 5 µl Phagensuspension aus Pool X
- 5 µl 10 * PCR Puffer (AGS)
- 5 µl 2 mM dNTP Mix
- 30 pmol K1
- 30 pmol K2
- 2 U *Taq* DNA Polymerase (AGS)
- mit bidest. Wasser auf 50 µl auffüllen

Konsensus Primer K1:

5´-GGACACATCAACCCAGCGGTTACG-3´

Konsensus Primer K2:

5´-TCTTGCTGGGTTGATTCCAGTTCC-3´

Die Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet und die PCR mit folgenden Parametern durchgeführt:

94°C / 5 min			1 Zyklus
94°C / 30 s	45°C / 45 s	72°C / 45 s	40 Zyklen
72°C / 5 min			1 Zyklus

Je 5 µl der Reaktionen wurden im TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden mittels TA-Klonierung kloniert und anschließend sequenziert.

2.10 MARATHON „RACE“

Als „RACE“ wird eine PCR-basierte Methode zur schnellen Amplifizierung von cDNA-Enden („Rapid Amplification of cDNA Ends“) bezeichnet. Ausgehend von einer cDNA-Population mit beidseitig angefügten Adapttern ermöglicht diese Methode die Klonierung der fehlenden 5'- und 3'-Bereiche eines cDNA-Fragmentes, das z.B. aus der Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek hervorgegangen ist. Anhand der bekannten Nukleotidsequenz dieses cDNA-Fragmentes werden genspezifische Primer konstruiert (GSP1, GSP2), die in Kombination mit speziellen Adapterprimern (AP1) für die RACE-PCR eingesetzt werden. Die beiden resultierenden RACE-PCR-Produkte weisen dabei einen sich überlappenden Bereich auf. Nach erfolgreicher Klonierung und Sequenzierung der beiden PCR-Produkte wird mit einem neuen Paar genspezifischer Primer (VP1, VP2) die Amplifizierung der Vollängen-cDNA in einer LD-PCR-Reaktion („Long Distance“-PCR) ermöglicht. Die Abbildung 2-7 stellt schematisch den Ablauf des Marathon RACE dar.

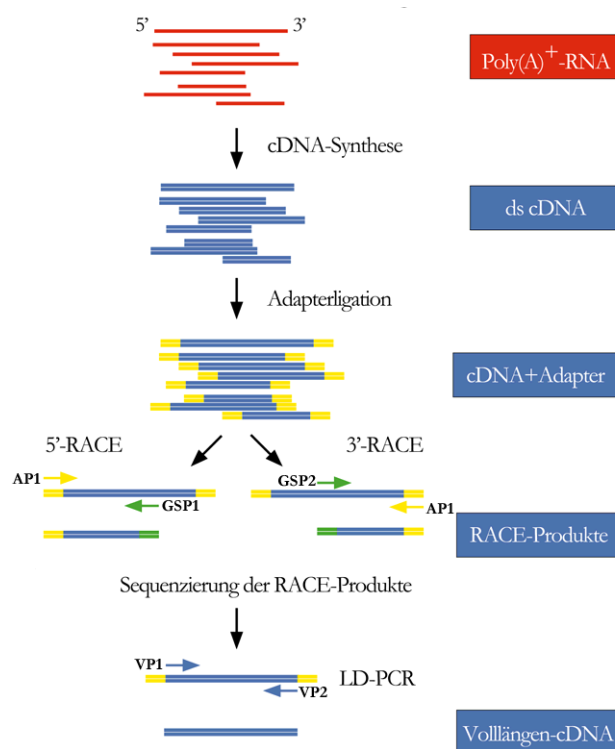


Abbildung 2-7: Flußdiagramm der einzelnen Arbeitsschritte. Rot dargestellt ist die mRNA-Population, die im ersten Schritt in eine doppelsträngige cDNA (blau) umgeschrieben wird. Im nächsten Schritt werden Adapter (gelb) angeheftet. Im folgenden 5'- bzw. 3'-RACE wird der Adapterprimer AP1 (gelber Pfeil) in Kombination mit jeweils einem genspezifischen Primer (GSP1, GSP2; grüne Pfeile) eingesetzt. Nach Klonierung und Sequenzierung der beiden RACE-Produkte, wird mit einem neuen Paar genspezifischer Primer (VP1, VP2; blaue Pfeile) die gesuchte Vollängen-cDNA in einer LD-PCR amplifiziert.

2.10.1 cDNA-SYNTHESE

Zur Durchführung wurde das Marathon cDNA Amplification Kit der Firma Clontech entsprechend den Angaben des Herstellerprotokoll verwendet. Unter Verwendung der mitgelieferten Komponenten wurde zunächst 1 µg Poly(A)⁺-mRNA in die korrespondierende doppelsträngige cDNA umgeschrieben.

Erststrangsynthese: 1 µg mRNA aus *Nicotiana tabacum* in 4 µl
10 pmol cDNA Synthese Primer in 1 µl

Synthese Primer: 5'-TTCTAGAATTCAGCGGCCGC(I)₃₀N₁N-3'

Der Ansatz wurde für 2 min bei 70 °C inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis gehalten. Es wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

2 µl 5 * Erststrangpuffer
1 µl dNTP Mix 10 mM
1 µl bidest. Wasser
1 µl MMLV Reverse Transkriptase 100 U/µl

Die Reaktion wurde bei 42 °C für 1 h inkubiert und anschließend auf Eis gehalten. Für die Zweitstrangsynthese wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

Zweitstrangsynthese: 48,4 µl bidest. Wasser
16 µl Zweitstrangpuffer
1,6 µl dNTP Mix 10 mM
4 µl 20 * Enzym-Mix

Der Ansatz wurde für 1,5 h bei 16 °C inkubiert und nach Zugabe von 2 µl T4 DNA Polymerase für weitere 45 min bei 16 °C belassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl EDTA/Glycogen-Mix abgestoppt und mit 100 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol extrahiert. Die cDNA wurde mit 0,5 Volumen 4 M NH₄Acetat und 2,5 Volumen 98 % Ethanol bei 14.000 Upm gefällt und das Sediment mit 300 µl 70 % Ethanol von Salzen befreit. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 10 µl bidest. Wasser gelöst. Davon wurden 5 µl für die folgende Adapterligation eingesetzt:

Adapterligation: 5 µl cDNA
2 µl Marathon Adapter
2 µl 5 * DNA Ligase Puffer
1 µl T4 DNA Ligase (1U/µl)

Marathon Adapter:

Der Ansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert.

2.10.2 5'- UND 3'-RACE PCR

Zunächst wurde ein Aliquot der Ligationsreaktion 1:50 verdünnt. Diese Verdünnung wurde für die folgenden PCR-Reaktionen eingesetzt. Hierfür wurden zusätzlich Komponenten des „Advantage cDNA PCR Kit“ der Firma Clontech verwendet. Die genspezifischen Primer wurden mit der Software Oligo 5.0 konstruiert und hinsichtlich ihrer Eigenschaften charakterisiert. Dabei wurden die Empfehlungen des Herstellerprotokolls berücksichtigt. Die Primer wurden von der Firma MWG bezogen. Da sich die Reaktionsansätze nur durch die eingesetzten genspezifischen Primer unterscheiden wurde folgender Master-Mix hergestellt:

Master-Mix (98 µl): 10 µl cDNA + Adapter (1:50 verdünnt)
 64 µl bidest Wasser
 10 µl dNTP Mix 2 mM
 10 µl 10 * Reaktionspuffer
 2 µl Advantage KlenTaq Polymerase Mix
 20 pmol AP1 Primer

AP1-Primer: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

5'-RACE-PCR (50 µl): 49 µl Master-Mix
 10 pmol genspezifischer „Antisense“ Primer 1 (GSP1)

3'-RACE-PCR (50 µl): 49 µl Master-Mix
 10 pmol genspezifischer „Sense“ Primer 2 (GSP2)

Die beiden PCR-Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet und die Reaktionen mit folgenden Parametern durchgeführt:

94°C / 1 min		1 Zyklus
94°C / 30 s	72°C / 2 min	5 Zyklen
94°C / 30 s	70°C / 2min	5 Zyklen
94°C / 20 s	68°C / 2 min	25 Zyklen

Je 5 µl der Reaktionsansätze wurden im TAE-Agarosegel aufgetrennt. Je 1 µl der Reaktionsansätze wurden für eine TA-Klonierung eingesetzt (s. 2.7.1). Nach Charakterisierung der PCR-Produkte

wurde ein neues Paar genspezifischer Primer (VP1, VP2) konstruiert und die Vollängen-cDNA amplifiziert. Dazu wurde folgender Ansatz zusammengestellt:

<u>LD-PCR-Ansatz:</u>	5 µl cDNA + Adapter (1:50 verdünnt)
	32 µl bidest Wasser
	5 µl dNTP Mix 2 mM
	5 µl 10 * Reaktionspuffer
	1 µl Advantage KlenTaq Polymerase Mix
	1 µl 10 pmol VP1 Primer
	1 µl 10 pmol VP2 Primer

Der PCR-Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet. Die PCR-Reaktionen wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

94°C / 1 min			1 Zyklus
94°C / 30 s	50°C / 30 s	68°C / 210 s	35 Zyklen

Von der Reaktion wurden 5 µl im TAE-Agarosegel aufgetrennt und 1 µl für eine TA-Klonierung eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde anschließend sequenziert und die gewonnen Sequenzdaten mittels Software analysiert (s. 2.8).

2.11 GEZIELTER AUSTAUSCH VON NUKLEINSÄUREN

Die gezielte Veränderung der Aminosäuresequenz eines Proteins wurde durch Veränderungen der entsprechenden cDNA vorgenommen. Hierfür wurde das „QuikChange Site-Directed Mutagenesis“ System der Firma Stratagene verwendet. Dieses System basiert auf einem PCR-Verfahren mit rekombinanter Plasmid-DNA als Matrize und erlaubt sowohl Punktmutationen, als auch die Deletion bzw. Insertion einzelner oder mehrerer Nukleinsäuren. Dabei werden speziell konstruierte Primerpaare und eine *Pfu*-DNA Polymerase mit definierten Eigenschaften verwendet. Die zuvor aus *E. coli* isolierte Eltern-DNA liegt methyliert vor (N⁶-Methyladenine) und kann dadurch nach Synthese der mutierten Tochterstränge gezielt durch die Endonuklease *Dpn* I abgebaut werden. Abschließend wird die mutierte, nicht methylierte Plasmid-Population direkt ohne weitere Subklonierungsschritte für eine Transformation eingesetzt. Die Abbildung 2-8 stellt den experimentellen Ablauf schematisch dar:

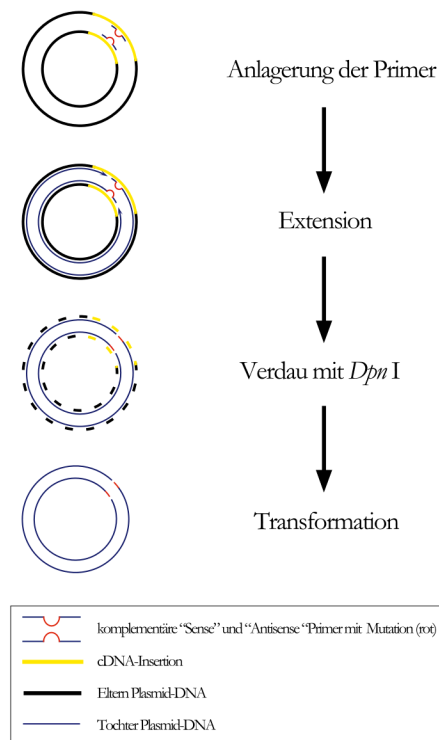


Abbildung 2-8: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs.

2.11.1 KONSTRUKTION DER PRIMER

An die Primer werden besondere Anforderungen gestellt. Die Gesamtlänge der Primer richtet sich nach der Länge der gewünschten Mutation und sollte in einem Bereich von 25 bis 45 Basen liegen. Dabei sollte sich die Mutation in der Mitte befinden und von etwa 10 bis 15 nicht modifizierten Nukleotiden flankiert sein. Im Gegensatz zu einer Standard-PCR sind bei dieser Methode die beiden Primer exakt komplementär zueinander und müssen daher bei der Reaktion im Überschuß vorhanden sein. Der Hersteller empfiehlt einen GC-Gehalt von mehr als 40% und einem Schmelzpunkt („melting temperature“, T_m) der Primer oberhalb von 78 °C. Dieser konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$$T_m = 81,5 + 0,41 * (\%GC) \frac{675}{n} - \frac{\text{Länge Mutation [bp]} *}{n} \quad \text{[Gleichung 11]}$$

n = Länge des Primers in Basenpaaren

%GC = prozentualer GC-Gehalt des Primers

Die Primer wurden von der Firma MWG bezogen und waren mittels HPLC aufgereinigt.

2.11.2 PCR-REAKTION

Der Reaktionsansatz wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers zusammengestellt. Dabei konnte die Menge an Matrizen-DNA in einem Bereich von 5 bis 50 ng variiert werden.

<u>PCR-Ansatz:</u>	5 μ l 10 * PCR-Puffer
	5 - 50 Matrizen-DNA
	125 ng Primer 1
	125 ng Primer 2
	1 μ l dNTP Mix
	mit bidest. Wasser auf 50 μ l auffüllen
	1 μ l <i>Pfu</i> DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l)
	Der Ansatz wurde mit 30 μ l Mineralöl überschichtet

Die Stocklösungen der Primer waren standardmäßig auf 100 pmol/ μ l eingestellt. Mittels folgender Formel konnte das benötigte Volumen berechnet werden:

$$\text{pmol Primer} = \frac{125 \text{ ng} * 1.000}{(n * 325)} \quad \text{[Gleichung 12]}$$

n = Länge des Primers in Basenpaaren

Die Parameter für die PCR-Reaktion richteten sich nach der Größe der eingesetzten Plasmid-DNA, sowie nach der Art der Mutation. Die Syntheszeit betrug 2 min je 1000 Basenpaare Plasmid-DNA. Für eine Punktmutation waren 12 Zyklen, für das Einfügen oder Entfernen einer Aminosäuren (1 Basentriplet) 16 Zyklen und für mehrere Aminosäuren 18 Zyklen erforderlich.

95°C / 30 s			1 Zyklus
95 °C / 30 s	55 °C / 1 min	68 °C / x min	x Zyklen

Die Reaktion wurde anschließend so lange auf Eis gehalten, bis die Temperatur des Ansatzes unterhalb 37 °C lag. Es folgte die Zugabe von 1 μ l der Endonuklease *Dpn* I (10 U/ μ l) und eine Inkubation bei 37 °C für 1 h. Hierbei wurde spezifisch die Eltern-DNA abgebaut (Erkennungssequenz 5'-G^{m6}ATC-3'), da diese im Gegensatz zur neu synthetisierten, mutierten Plasmid-DNA methyliert ist.

Abschließend wurde 1 μ l des Ansatzes für eine Transformation eingesetzt. Dazu wurden die vom Hersteller beigefügten kompetenten Zellen (*Episcurian coli* XL1-Blue) verwendet. Der Bakterienstamm hat folgenden Genotyp: *recA1 endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac* {F^c *proAB lacI^qZ M15 Tn10 (Tet^r)*}^c.

Die Transformation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers Stratagene. Dazu wurden 1 µl des Reaktionsansatzes mit 50 µl der Bakteriensuspension vermischt und für 30 Min im Eisbad inkubiert. Dann wurden die Bakterien einem Hitzeschock (42 °C für 45 s) ausgesetzt. Nach erneuter Abkühlung im Eisbad wurde die Suspension mit 500 µl NZY+-Medium bei 37 °C für 1 h mit 225 Upm geschüttelt. Der Transformationsansatz wurden vollständig auf LB-haltigem Agar-Nährboden (s 2.7.3), welcher Ampicillin (50 µg/ml), IPTG (60µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml) enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

<u>NZY+-Medium:</u>	10 g NZ Amin (Kasein Hydrolysat)
	5 g Hefe-Extrakt
	5 g NaCl
	Autoklavieren
	12,5 ml 1M sterile MgCl ₂ -Lösung
	12,5 ml 1M sterile MgSO ₄ -Lösung
	20 ml 20% sterile Glukose-Lösung

Von den Kolonien wurden DNA-Minipräparationen hergestellt und die gewonnene Plasmid-DNA für eine Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzdaten wurden hinsichtlich der eingefügte Mutation überprüft.

2.12 SYNTHESE VON CRNA (IN VITRO TRANSKRIPTION)

Für die heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten wurden die cDNA-Klone zunächst in den speziell konstruierten Vektor pGemHE (Liman *et al.*, 1992) in definierter Orientierung umklontiert. Hierfür konnten 7 verschiedene Restriktionsstellen im Vektor genutzt werden, welche von den untranslatierten Regionen (5' UTR und 3' UTR, siehe Abbildung 2-9) des *Xenopus* -Globulins flankiert sind. Dieses soll eine Diskriminierung der pflanzlichen Gene durch den Translationsapparat der Oozyten verhindern und so die Translationseffizienz erhöhen. Um in der Reaktion cRNA-Moleküle mit einer definierten maximalen Länge zu erhalten („run-off Synthese“), wurden zunächst 5 µg hochreine Plasmid-DNA (siehe 2.3.1.2) durch die Restriktionsendonuklease *Nbe* I (MBI Fermentas) linearisiert (siehe 2.3.2). Alternativ konnten *Pst* I bzw. *Sph* I verwendet werden. Eine mögliche Kontamination mit RNasen wurde durch eine anschließende Inkubation des Ansatzes in Gegenwart von Proteinase K (Sigma, 200 µg/ml) und SDS (0,5%) bei 50 °C für 1 h entfernt. Die DNA wurde hiernach mittels Phenol/Chloroform (Fluka) Extraktion aufgereinigt. Spuren von Phenol wurden durch erneute Extraktion mit Chloroform entfernt. Die DNA wurde durch Ethanol-fällung sedimentiert, von Salzen befreit und in einem geeigneten Volumen RNase-freiem Wasser gelöst. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und ein Aliquot der DNA-Lösung im Agarosegel aufgetrennt. Für die *in vitro* Transkription wurde das MEGAscript T7

System (Ambion) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Dazu wurde 1 µg der zuvor aufgearbeiteten Plasmid-DNA eingesetzt und der vollständige Reaktionsansatz für mindestens 2 h in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Ausbeute an cRNA wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.2.1.2) und ein Aliquot der cRNA-Lösung auf 0,5 µg/µl verdünnt. Zur Kontrolle wurden 500 ng der cRNA in einem denaturierenden RNA-Agarosegel (siehe 2.2.3) aufgetrennt.

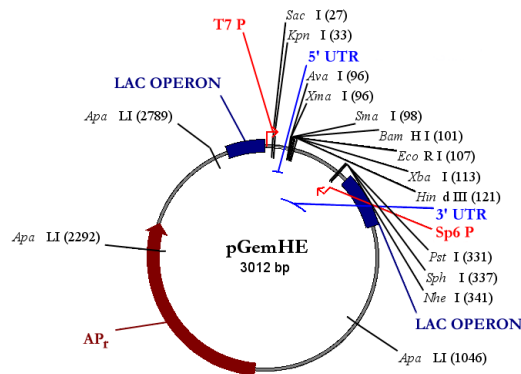


Abbildung 2-9: Aufbau des Vektors pGemHE. Vermerkt ist das Gen für die Ampicillin-Resistenz (APr) und das Lactose Operon (LAC OPERON). Die Polylinker-Region mit den zur Verfügung stehenden Restriktionsschnittstellen befindet sich stromaufwärts vom Startpunkt für die *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase (T7 P) und wird von den untranslatierten Regionen (5' UTR und 3' UTR) des *Xenopus*-Globulin-Gens flankiert.

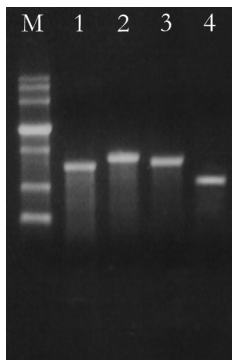


Abbildung 2-10: Auftrennung von 4 beispielhaft ausgewählten cRNA-Spezies im 1% MEN-Agarosegel. Als Größenstandard wurde der RNA-Marker (M) verwendet (s. 2.2.3). Die Spuren 1 - 4 repräsentieren je 500 ng folgender cRNA-Spezies: 1= NtAQP1; 2= SsAQP1; 3= SsAQP2; 4= TIP.

2.13 VERFAHREN MIT OozyTEN VON XENOPUS LAEVIS

2.13.1 PRÄPARATION DER OozyTEN

Die südafrikanischen Krallenfrösche (Nasco, Fort Atkison Texas, USA) wurden paarweise in Aquarien bei 20 – 22 °C Wassertemperatur gehalten. Die Entnahme der Oozyten erfolgte nach Narkotisierung des Frosches mit Tricaine (3-Aminobenzoessäure-ethylester; 0,75 g/l) unter Eiskühlung. Die Haut des Frosches wurde dabei, bis auf das Operationsfeld, mit feuchten Tüchern abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Das Muskelgewebe und die Bauchhaut wurden nach dem operativen Eingriff mit 2 – 3 Stichen genäht. Die entnommenen Ovarlappen, die mehrere

Hundert Oozyten enthielten, wurden mit feinen Uhrmacherpinzetten derart getrennt, dass nur noch 5 – 8 Oozyten zusammenhingen. In Ca^{2+} -freier ND96-Lösung (s.u.) wurden die so vereinzelt Oozyten mehrfach gewaschen und durch Kollagenasebehandlung (1-2 mg/ml) von den Follikelzellen befreit. Dazu wurden die Oozyten in einer Petrischale (40 mm) bei Raumtemperatur für 1 h auf einem Rundschüttler vorsichtig geschwenkt. Nach erneutem Waschen mit Ca^{2+} -freier Lösung wurden die Oozyten in ND96-Lösung mit Penicillin und Streptomycin (je 100 U/ml) bei 16 °C aufbewahrt.

ND96-Lösung:

96 mM NaCl

2 mM KCl

1 mM CaCl_2

1 mM MgCl_2

10 mM Mes/NaOH pH 7,4

Die Lösung wurde am Osmometer (Vapor Pressure 5500, Schlag GmbH Bergisch Gladbach) mit D-Sorbitol auf 220-230 mosmol/kg eingestellt.

2.13.2 INJEKTION VON CRNA

Die Injektion der cRNA wurde 18 – 24 h nach der Präparation der Oozyten (siehe 2.4) durchgeführt. Dazu wurden zunächst Glaskapillaren ($3\frac{1}{2}$ “ Drummond #3-00203-g/X, Drummond Scientific Company) mit einem Laser-Ziehgerät (Sutter Instruments Co. Model p-2000) zu Mikropipetten ausgezogen. Die feine Spitze wurde unter dem Mikroskop abgebrochen und nach kurzem Kontakt mit einem Heizdraht (Mikroschmiede, Leitz) durch schnelles Abziehen eine kanülenartige Öffnung geformt. Der Durchmesser der so hergestellten Injektionskapillare betrug maximal 1 – 2 μm . Die auf 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellte cRNA-Lösung wurde in die Injektionskapillare aufgesogen und mittels eines kontrollierten Druckstoßes (General Valve Picospritze II, USA) etwa 10 – 20 ng der cRNA in die Oozyten injiziert. Die Expression der jeweiligen Membranproteine konnte nach einer Inkubation bei 16 °C in einem Zeitraum von 48 h - 65 h nachgewiesen werden.

2.13.3 SCHWELLUNGSEXPERIMENTE MIT OOZYTEN

Ein Stereomikroskop (SM22-140-F, Firma Hund, Wetzlar) mit integrierter Beleuchtungseinheit und montierter Digitalkamera (Pixera PVC100C, Pixera Corporation, USA) wurde zur Erfassung der Volumenzunahme von Oozyten verwendet. Die Beleuchtung erfolgte dabei von unten und wurde so justiert, dass die Oozyten als schwarze Scheiben auf hellem Hintergrund erschienen. Dieses ermöglichte die automatische Auswertung durch das Bildanalyseprogramm Scion-Image 0.94b3 (Scion Corporation, USA; <http://www.scioncorp.com>). Mittels einer Pasteurpipette wurden jeweils 2 Oozyten in das hypoosmotische Medium (70 mosmol ND96) überführt und ein Startbild

aufgenommen. Die Verwendung der Steuerungssoftware „Pixera Visual Communication Suite“ gestattete die automatische Aufnahme weiterer Einzelbilder in einem definierten Intervall und Zeitrahmen. Die so erfaßten Einzelbilder wurden in das Bildanalyseprogramm importiert und nach Definition von Schwellenwert und Kalibrierungsfaktor wurden die Querschnittsflächen durch ein Unterprogramm automatisch ermittelt (siehe 7.3). Die weitere Berechnung erfolgte mit der Software Excel (Microsoft). Die Umrechnung der Flächeninhalte in ein theoretisches Volumen erfolgte durch die Formel:

$$V = \left(\sqrt{2q/} \right)^3 \frac{1}{6} \quad \text{[Gleichung 13]}$$

V=Volumen in [mm³]

q=Fläche in [mm²]

Zur Berechnung des Wasserpermeabilitätskoeffizienten P_f als Maß für die Transportgeschwindigkeit von Wassermolekülen über die Membran wurde die Formel nach Zhang und Verkman (1991) angewendet:

$$P_f = V_0 \left[d \left(V_x / V_0 \right) / dt \right] * \left[S * V_w \left(\text{Osm}_{\text{innen}} - \text{Osm}_{\text{außen}} \right) \right] \quad \text{[Gleichung 14]}$$

V_0 = Startvolumen der Oozyte in [cm³]

V_x = Volumen der Oozyte zum Zeitpunkt (x) in [cm³]

S = Startoberfläche der Oozyte in [cm²]

V_w = molares Volumen des Wassers [18 cm³ mol⁻¹]

$\text{Osm}_{\text{innen}}$ = Osmolarität innen [mosmol * 10⁻⁶ * cm⁻³]

$\text{Osm}_{\text{außen}}$ = Osmolarität außen [mosmol * 10⁻⁶ * cm⁻³]

2.13.4 AUFNAHME VON GLYCERIN UND HARNSTOFF

Einzelne Oozyten wurden 3 Tage nach der Injektion der cRNA in 1,5 ml Reaktionsgefäße mit je 100 µl Lösung 1, bzw. Lösung 2 überführt. Als Kontrolle dienten Oozyten, in die nur Wasser injiziert wurde. Die Ansätze wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die radioaktive Lösung quantitativ entfernt. Die Oozyten wurden 4 mal mit je 0,5 ml eiskalter ND96-Lösung gewaschen und in je 100 µl 10% SDS über Nacht bei Raumtemperatur lysiert. Die aufgenommene Radioaktivität wurde nach Zugabe von je 4 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler gemessen.

<u>Lösung 1:</u>	ND96-Lösung (220 mosmol/kg ; s. 2.13.1) 0,5 mM [³ H]-Glycerin (3,7 MBeq/ml; spezifische Aktivität 200 mCi/mmol)
<u>Lösung 2:</u>	ND96-Lösung (220 mosmol/kg) 1,82 mM [¹⁴ C]-Harnstoff (3,7 MBeq/ml; spezifische Aktivität 55 mCi/mmol) Die Radiochemikalien wurden von der Firma ICN bezogen.

Zur Auswertung wurde von den Messwerten jeder Messreihe der Mittelwert gebildet und in Relation zum Mittelwert von mit Wasser injizierten Oozyten gesetzt.

2.13.5 STIMULATION DER AQUAPORINAKTIVITÄT

Die Stimulation der Wassertransportaktivität von Aquaporinen wurden in Anlehnung an die Experimente von Maurel *et al.* (1995) durchgeführt. Dazu wurden transformierte Oozyten 3 Tage nach der Injektion in eine isotonische ND96-Lösung überführt, die zusätzlich 8-Br-cAMP, Forskolin und IBMX enthielt. Die Oozyten wurden in diesem Medium vor Durchführung der Schwellungsexperimente (s. 2.13.3) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die stimulierende Wirkung der Substanzen beruht auf einer Anhebung des intrazellulären cAMP-Spiegel und der Aktivierung der endogenen Proteinkinase A. Bei 8-Br-cAMP handelt es sich um ein membranpermeables Analogon zu cAMP. Während Forskolin die endogene Produktion von cAMP durch eine Adenylatcyclase aktiviert, hemmt IBMX die Degradation von cAMP durch Phosphodiesterasen.

<u>Lösung:</u>	ND96-Lösung (220 mosmol/kg ; s. 2.13.1) 0,5 mM 8-Br-cAMP (8-Bromoadenosin 3',5'-zyklisches Monophosphat) 50 µM Forskolin 0,5 mM IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin) Die Substanzen wurden von der Firma Sigma bezogen
----------------	---

2.13.6 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE STUDIEN

Die Permeabilität von Aquaporinen für Ionen wurde mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (Finkel und Gage, 1985) ermittelt. Diese Methode wurde ursprünglich zur Bestimmung charakteristischer Parameter von Ionenkanälen etabliert und ermöglicht die Stromableitung von der Plasmamembran der Oozyten bei konstanter Membranspannung. Vor Beginn der Experimente wurde eine Vorauswahl der Oozyten durch Schwellungsexperimente getroffen. (s. 2.13.3).

2.13.6.1 DAS MESSPRINZIP

Bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik mißt eine der beiden eingestochenen Elektroden das Membranpotential (Spannungselektrode) in Relation zum Potential der Badelektrode. Die zweite intrazelluläre Elektrode (Stromelektrode) speist über eine Rückkopplungsschleife einen ausreichenden Strom in die Zelle, um die gewünschte Potentialdifferenz aufrechtzuerhalten. Dieser Strom wird durch den Unterschied zwischen der Membran- und der Kommandospannung vorgegeben und stellt ein direktes Maß für die Kanalströme dar. Nach einer sprunghaften Änderung der Membranspannung setzt sich der gemessene Strom aus einem kapazitiven Strom I_{kap} und dem Strom zusammen, der durch die Membranproteine hervorgerufen wird.

2.13.6.2 DER MESSAUFBAU

Der mechanooptische Teil der Messapparatur umfaßte eine Badkammer mit Perfusionssystem (LKB Pump P1, Pharmacia), die Mikromanipulatoren (Luigs und Neumann) und ein Stereomikroskop (SZ40, Olympus) inklusive einer Lichtquelle (KL 1500 electronic, Schott). Zur mechanischen Entkopplung des Aufbaus war dieser auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert. Zusätzlich sorgte ein Faradaykäfig für eine Abschirmung gegenüber elektrischen Störungen der Umgebung. Die leitenden Bestandteile der Messeinheit wurden geerdet und die Flüssigkeitssäule im Schlauchsystem durch eine eingefügte silanisierte Glasolive unterbrochen. Die Badkammer gewährleistete, dass die Oozyten gleichmäßig mit der jeweiligen Messlösung umspült wurden. Die Perfusionsrate betrug während der Messung 0,3 bis 0,4 ml * min⁻¹. Als Messverstärker diente ein Gerät der Firma NPI electronics (Turbo TEC 01C). Dieser war über einen 16 Bit AD/DA-Wandler (ITC-16ST, Instrutech Corporation) mit einem Messrechner (Apple Macintosh Centris 500) verbunden, so dass die Stromantwort der Membran anhand des computersimulierten Oszilloskops verfolgt werden konnte. Verschiedene Spannungspuls-Protokolle wurden im Pulsgenerator der Software „Pulse“ (HEKA, Lambrecht) erstellt und mittels Computer über den Spannungseingang/-ausgang des Messverstärkers an die Membran angelegt.

2.13.6.3 ELEKTRODEN UND PIPETTEN

Als Mess- und Referenzelektrode wurden Silber/Silberchlorid-Elektroden verwendet, die durch elektrolytische Chlorierung eines Silberdrahtes (World Precision Instruments, Berlin) in 0,1 M Salzsäure hergestellt wurden. Die Elektroden wurden jeweils in eine 3 M KCl-Lösung eingetaucht. Eine Potentialänderung an der Referenzelektrode durch Messlösungen mit verschiedenen Chloridkonzentrationen wurde minimiert, indem auf die Referenzelektrode ein ebenfalls mit 3 M KCl gefüllter Schlauch gesteckt wurde. Der Schlauch wurde mit einem Agarstopfen verschlossen

(2% Agar in 3 M KCl), um die Diffusion von K^+ und Cl⁻ in die im Vergleich niedermolaren Messlösungen zu verhindern. Die auf die Elektroden der Vorverstärker gesteckten Einstichpipetten wurden mit Hilfe eines Laser-Ziehgerätes (s. 2.13.2) aus Borosilikatglaskapillaren (KWIK-FIL[®], World Precision Instruments Inc., USA) gezogen. Diese wurden mit 3 M KCl-Lösung gefüllt und hatten einen Widerstand von 1-6 M Ω .

2.13.6.4 MESSLÖSUNGEN

Als Messlösung wurde folgende Standardlösung verwendet:

Für Messungen der K^+ -Permeabilität:

2 mM MgCl₂
10 mM Mes/Tris, pH 5,6
100 mM KCl
1 mM CaCl₂

Für Messungen der Na^+ -Permeabilität:

2 mM MgCl₂
10 mM Mes/Tris, pH 5,6
100 mM NaCl
1 mM CaCl₂
Die Lösungen wurden mit D-Sorbitol auf 220 - 240 mosmol * kg⁻¹ eingestellt.

2.13.7 FUSION VON AQUAPORINEN MIT „GREEN FLUORESCENCE PROTEIN“

Das GFP-Gen (englisch: „Green Fluorescence Protein“) wurde ursprünglich aus dem Cnidaria *Aequoria victoria* isoliert und dient als Reporter für *in vivo* Studien auf Zellebene bis hin zu Gesamtpflanzen. Die fluorophore Gruppe (ein p-Hydroxybenzylidenimidazolinon Chromophor) geht aus einer Zyklisierung der Aminosäuren Serin65, Tyrosin66 und Glycin67 mit anschließender 1,2-Dehydrogenierung des Tyrosin hervor. Das Anregungsspektrum des GFP-Wildtyps weist 2 Maxima bei 396 (UV-Licht) und 475 nm (blaues Licht) auf. Die resultierende grüne Fluoreszenz hat ihr Maximum bei 508 nm. Durch Aminosäuresubstitutionen in der Chromophorregion konnten die spektralen Eigenschaften von GFP variiert und negative Eigenschaften wie Photoisomerisation und Bleichung reduziert werden. Bei dieser Studie wurde das im Vektor pUC118 vorliegende „sm RS-GFP“ (englisch: soluble modified Red Shifted GFP) verwendet (ABRC; USA). Die Anregung erfolgte mittels Blaulicht (470 - 490 nm). Die emittierte Fluoreszenz wurde im Bereich von 500 - 520 nm detektiert. Dazu wurde ein Kamerasystem der Firma Intas verwendet (Intas XC-003P), dass auf einem Stereomikroskop (MZ FLIII; Leica) bzw. einem Mikroskop (Axioplan; Zeiss) montiert war.

Die funktionelle Charakterisierung von SsAQP1 und SsAQP2 (Doktorarbeit Karsten Grote, 1998) zeigte, dass SsAQP2 eine ca. 10fach höhere Wasserpermeabilität vermittelte als SsAQP1. Unter der Annahme, dass jeweils identische Mengen an cRNA injiziert wurden, ist dieser Unterschied auf die Eigenschaften von SsAQP2, bzw. auf eine höhere Translationseffizienz der SsAQP2-cRNA zurückzuführen. Die Fusion von GFP mit SsAQP1 bzw. mit SsAQP2 sollte eine relative Quantifizierung der Aquaporinmenge in der Oozytenmembran ermöglichen. Die Abbildung 2-11 bis Abbildung 2-13 verdeutlichen die Strategie der Vorgehensweise. In einer PCR-Reaktion mit „sm RS-GFP“ als Matrize und der Primerkombination „GFP *Bam* HI sense/GFP *Not* I antisense“ wurde ein PCR-Produkt (GFP-Fusion) mit einer Länge von 743 bp amplifiziert. In weiteren PCR-Reaktionen mit SsAQP1-cDNA (Primer „SsAQP1 *Not* I sense/SsAQP1 *Hin* dIII antisense“) bzw. SsAQP2-cDNA (Primer „SsAQP2 *Not* I sense/SsAQP2 *Hin* dIII antisense“) als Matrize, wurden die PCR-Produkte SsAQP1-Fusion (882 bp) und SsAQP2-Fusion (876 bp) amplifiziert. Die Primer „GFP *Not* I antisense“, „SsAQP1 *Not* I sense“ und „SsAQP2 *Not* I sense“ wurden derart konstruiert, dass bei der Fusion über die Restriktionsschnittstelle *Not* I die Leseraster von GFP und Aquaporin erhalten bleiben und nahtlos in einander übergehen. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt, eluiert und einem Restriktionsabbau mit *Not* I unterzogen. In einer Ligationsreaktion wurden die cDNA-Fragmente zu GFP:SsAQP1 (1619 bp) bzw. GFP:SsAQP2 (1613 bp) fusioniert. Die beiden Konstrukte wurden mittels PCR-Reaktion unter Verwendung der Primerkombinationen „GFP *Bam* HI sense/SsAQP1 *Hin* dIII antisense“ bzw. „GFP *Bam* HI sense/SsAQP2 *Hin* dIII antisense“ amplifiziert. Abschließend wurden die entstandenen PCR-Produkte (Abbildung 2-13) über die Restriktionsschnittstellen *Bam* HI und *Hin* dIII in den Expressionsvektor pGemHE kloniert.

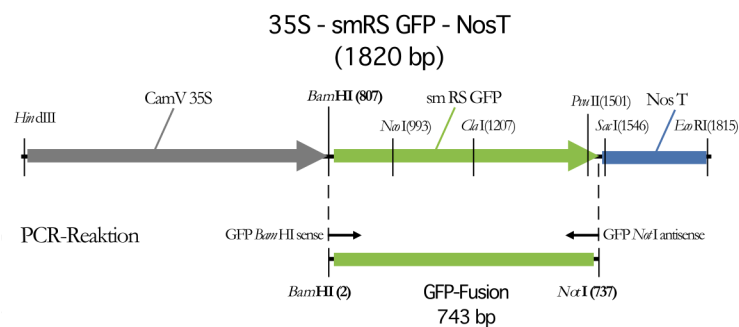


Abbildung 2-11: 1820 bp langer Bereich der „CamV 35S-GFP-NosT“ Kasette in pUC118. Die für die PCR-Reaktion verwendeten Primer, sowie das amplifizierte cDNA-Fragment (GFP-Fusion, grün) mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen sind dargestellt.

Primer SsAQP1 *Hin* dIII antisense:

5´-AAGCTTTCACTTGGACTTGAAGGGAATGG-3´
Hin dIII

Primer SsAQP2 *Not* I sense:

5´-GCGGCCGCAATGGCTAAGGACGTTGAGG-3´
Not I

Primer SsAQP2 *Hin* dIII antisense:

5´-AAGCTTTTTAAACAGAAGGGTTGC-3´
Hin dIII

2.13.8 FARBREAKTION MIT β -GLUCURONIDASE („GUS-ASSAY“)

Die β -Glucuronidase ist ein Enzym aus *E. coli* das Glucuronide als Substrat umsetzt. Wird anstelle von Glucuroniden das Struktur analogon X-Gluc angeboten entsteht ein blauer Farbstoff, der histochemisch nachgewiesen werden kann. Bei Studien zur Promotoraktivität in pflanzlichen Geweben unter dem Einfluss von endogenen (z.B. Hormone) und exogenen (z.B. Licht) Faktoren wird das GUS-Gen als Reportergen benutzt.

Bei der vorliegenden Methode wurde der GUS-Assay zur Beurteilung der durchschnittlichen Translationseffizienz von Oozyten verwendet. Dazu wurden zufällig ausgewählte Oozyten mit GUS-cRNA transformiert und nach einer zweitägigen Inkubation einzeln in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit je 50 μ l GUS-Färbelösung überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Da die 1,9 kb große β -Glucuronidase-cDNA nicht in einem für die *in vitro* Transkription geeigneten Vektor vorlag, musste die GUS-cDNA zunächst in den Oozyten-Expressionsvektor pGemHE subkloniert werden. Aufgrund nicht vorhandener kompatibler Restriktionsschnittstellen, wurde der Vektor pBI221, der die β -Glucuronidase-cDNA enthielt, für eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die Reaktion wurde mit den in Kapitel 2.6.2 angegebenen Parametern unter Verwendung der Primer 35S-*Pst* I-sense und GUS-*Hin* dIII-antisense durchgeführt. Das entstandene PCR-Produkt mit einer Größe von 2,7 kb wurde zunächst in den Vektor pCR2.1 (s. 2.7.1) kloniert. Rekombinante Plasmide wurden für einen Restriktionsabbau mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Hin* dIII eingesetzt. Nach Auftrennung im Agarosegel wurde die 1,9 kb große β -Glucuronidase-cDNA aus dem Gel eluiert und für eine Ligation mit dem identisch behandelten Vektor pGemHE eingesetzt. Durch Restriktionsabbau wurde ein positiver Klon identifiziert und für die Synthese der GUS-cRNA eingesetzt. Die Abbildung 2-14 veranschaulicht die Klonierungsstrategie.

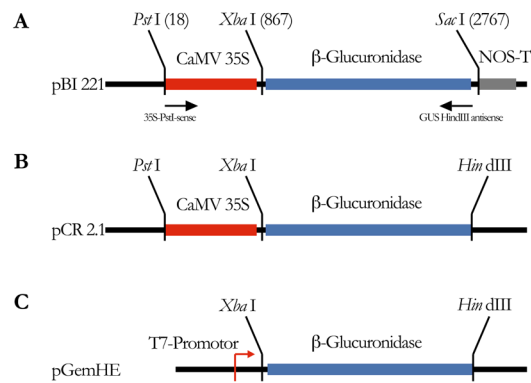


Abbildung 2-14: **A:** Ausschnitt aus der Polylinker-Region von pBI221 mit der ca. 1,9 kb großen β -Glucuronidase cDNA-Insertion (blau). **B:** Mittels PCR wurde im 3'-Bereich der GUS-cDNA eine zusätzliche *Hin* dIII Restriktionsschnittstelle eingefügt. **C:** Durch einen Restriktionsabbau mit *Xba* I und *Hin* dIII wurde die GUS-cDNA aus dem Vektor pCR2.1 isoliert und in den Vektor pGemHE kloniert.

Primer 35S-*Pst* I-sense:

5' - CTGCAGACCCACAGATGGTTAGAGAGG - 3'
 Pst I

Primer GUS-*Hin* dIII-antisense:

5' - AAGCTTGGTAGCAATTCCCCGAGGC - 3'
 Hin dIII

GUS-Färbelösung:

100 mg X-Gluc in 2 ml DMSO
 10 ml 1 M NaPO₄ pH 7
 2 ml 0,5 M EDTA
 100 μ l 0,5 M Kaliumferricyanid
 100 μ l 0,5 M Kaliumferrocyanid
 100 μ l Triton x100
 bidest. Wasser ad 100ml